

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO DE  
PNEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS CARINII* EM PORTADORES DA  
SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA**

**CARLOS CEZAR FRITSCHER**

**Orientador:** João Carlos Prolla

*Tese de Doutorado apresentada no Curso de Pós-Graduação em Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Medicina.*

Porto Alegre  
1993

FACULDADE DE MEDICINA  
UFRGS - FOPA  
BIBLIOTECA



*À minha esposa, Angélica, e aos nossos filhos, Leandro,  
Guilherme e Clarissa*

*Aos meus pais Helio (in memoriam)*

*e*

*Leda*

## AGRADECIMENTOS

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

- ao Dr. João Carlos Prolla, pela orientação segura e decisiva;
- à Dra. Ann Wakefield e ao Dr. Julian Hopkin, pelo ensinamento na área de medicina molecular e pelo fornecimento dos oligonucleotídeos iniciadores;
- Ao Dr. Vagner Ricardo Lunge, pelo auxílio na realização da reação em cadeia pela polimerase;
- ao Dr. Hugo Oliveira, pelo auxílio na colheita e obtenção do lavado broncoalveolar;
- à Dra. Ada R. S. Diehl pela minuciosa revisão do material citológico;
- à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pelo apoio durante o período de estudos na Universidade de Oxford;
- ao Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, pelo fornecimento do equipamento necessário à realização da reação em cadeia pela polimerase;
- à Profa. Maria do Horto Motta, pela revisão de linguagem e padronização técnica do texto.

# SUMÁRIO

**1 - INTRODUÇÃO / 9**

**2 - OBJETIVOS / 12**

**3 - REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE / 14**

3.1 - O MÉTODO / 14

3.2 - APLICAÇÃO DA PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS / 18

3.3 - APLICAÇÃO DA PCR EM DOENÇAS GENÉTICAS / 20

3.4 - APLICAÇÃO DA PCR EM MEDICINA FORENSE / 20

**4 - PNEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS CARINII* / 22**

**5 - MATERIAL E MÉTODOS / 27**

**6 - RESULTADOS / 33**

**7 - DISCUSSÃO / 47**

**8 - CONCLUSÕES / 64**

**9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS / 66**

**RESUMO**

**SUMMARY**

*If a man will begin with certainties, he shall end in doubts;  
but if he will be content to begin with doubts, he shall end in certainties.*

*Francis Bacon*

## **1 - INTRODUÇÃO**

---

## 1 - INTRODUÇÃO

O aumento do número de pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) tem sido responsável por uma ocorrência cada vez maior de infecções oportunistas no pulmão, especialmente as causadas por micobactérias ou por *Pneumocystis carinii*.

Este último agente, considerado por muito tempo como um protozoário e agora classificado pela maioria dos autores como um fungo, especialmente devido à sua constituição cromossômica, não é cultivado em meios de cultura *in vitro* e cora-se com dificuldade com os corantes habitualmente empregados na identificação de outros microorganismos, tornando muitas vezes difícil a sua identificação em espécimes clínicos.

A elevada e crescente prevalência de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, a dificuldade na identificação do fungo, a gravidade desta infecção, bem como sua resposta a um tratamento adequado e específico estavam a exigir o estabelecimento de um método diagnóstico que associasse alta sensibilidade, alta especificidade e rapidez na execução.

Na segunda metade da década passada, Mullis (70) juntamente com um grupo de pesquisadores da Cetus Corporation (33, 90, 91, 92, 93, 94) desenvolveram um método de amplificação de DNA com possibilidades de aplicação em várias áreas da medicina, mas com especial interesse no diagnóstico de doenças infecciosas cujos agentes etiológicos fossem de difícil identificação. O método foi denominado de reação em cadeia pela polimerase e hoje é internacionalmente conhecido pela sigla PCR.



A aplicação da PCR na identificação do *Pneumocystis carinii* foi desenvolvida no Instituto de Medicina Molecular de Oxford por Ann Wakefield e colaboradores (111), com excelentes resultados.

Em 1992, tivemos a oportunidade de trabalhar com esse grupo de pesquisadores ingleses com quem aprendemos a técnica. De volta ao Brasil, introduzimos, em nosso meio, o método da PCR na identificação de *Pneumocystis carinii*, valendo-nos da infra-estrutura do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul.

## **2 - OBJETIVOS**

---

## 2 - OBJETIVOS

1 - Aplicar o método da reação em cadeia pela polimerase na pesquisa de *Pneumocystis carinii* no lavado broncoalveolar e compará-lo com as técnicas convencionais utilizadas em nosso meio, que são: coloração de Leishman, Papanicolaou e prata de Grocott.

2 - Avaliar a prevalência de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, através da reação em cadeia pela polimerase, em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida que apresentem sintomas respiratórios e necessitem realizar broncofibroscopia com coleta de lavado broncoalveolar para esclarecimento diagnóstico.

### **3 - REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE**

---

### 3 - REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

#### 3.1 - O MÉTODO

O método da reação em cadeia pela polimerase consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA e foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores da Cetus Corporation a partir de 1985 (33, 90, 91, 92, 93, 94), após a invenção de Mullis (70).

A amplificação do DNA é baseada em ciclos repetitivos de três reações simples, realizadas em seqüência e com diferentes temperaturas. Estas reações ocorrem em um pequeno tubo, com reagentes termo-estáveis, colocado em um aparelho termo-ciclador, e o processo é completamente automatizado.

Além do DNA que será amplificado (DNA alvo), os reagentes importantes são: a) dois oligonucleotídeos também chamados de *primers* ou iniciadores, sintetizados para serem complementares a seqüências conhecidas do DNA alvo, b) quantidades suficientes dos quatro deoxirribonucleosídeos, e c) a Taq DNA polimerase termo-estável, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*.

A primeira etapa do procedimento é a desnaturação térmica da cadeia dupla de DNA, a qual pode ser oriunda de qualquer espécime clínico. Em temperatura próxima a 100° C, as ligações de hidrogênio se rompem, separando as cadeias de DNA e liberando, então, cadeias simples que podem, subseqüentemente, anelar-se a qualquer outro DNA que tenha uma seqüência complementar.

Na segunda etapa do ciclo, realizada em temperatura reduzida, dois pequenos oligonucleotídeos iniciadores são anelados em seqüências complementares de cadeias opostas do DNA alvo. Esses iniciadores são escolhidos de acordo com o material genético que está sendo procurado e definem as duas extremidades terminais de uma seqüência de DNA a ser amplificado. Eles não podem anelar-se um ao outro, e suas zonas de anelamento que indicarão o tamanho

dos fragmentos a serem ampliados devem ser suficientemente distantes uma da outra de modo a permitir a subsequente síntese de novos produtos.

A terceira etapa consiste na síntese de uma segunda cadeia complementar de um novo DNA, a qual ocorre pela extensão de cada iniciador, por ação da Taq polimerase, na presença de grandes quantidades de trifosfatos deoxirribonucleosídeos. Uma nova cadeia simples de DNA é sintetizada para cada iniciador a ele ligado. Cada nova cadeia consiste no iniciador em seu 5 final, ladeado por uma seqüência de nucleotídeos que são complementares à seqüência do DNA alvo (figura 1).

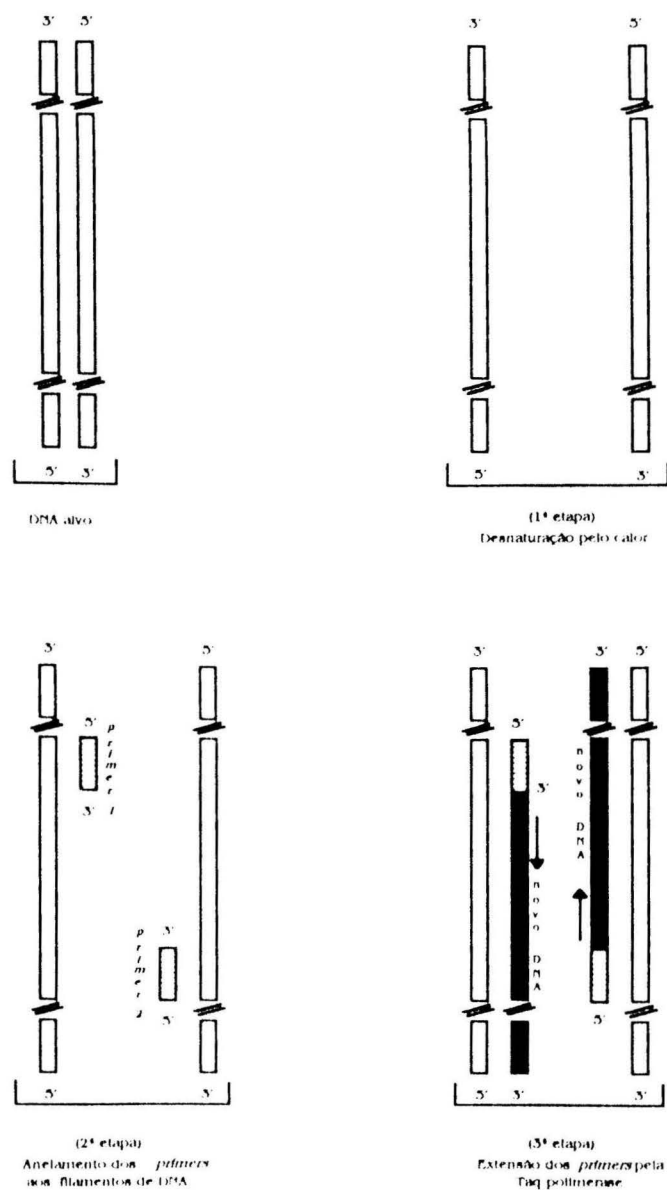


Fig. 1 - Primeiro ciclo da reação em cadeia pela polimerase

Após a extensão dos iniciadores o ciclo é repetido, inicialmente aumentando-se a temperatura de tal forma que as cadeias duplas do DNA sejam convertidas em cadeias simples e deixando-se então baixar a temperatura para permitir os passos de anelamento e extensão. Inicia-se a formação de fragmentos curtos de DNA (figura 2).

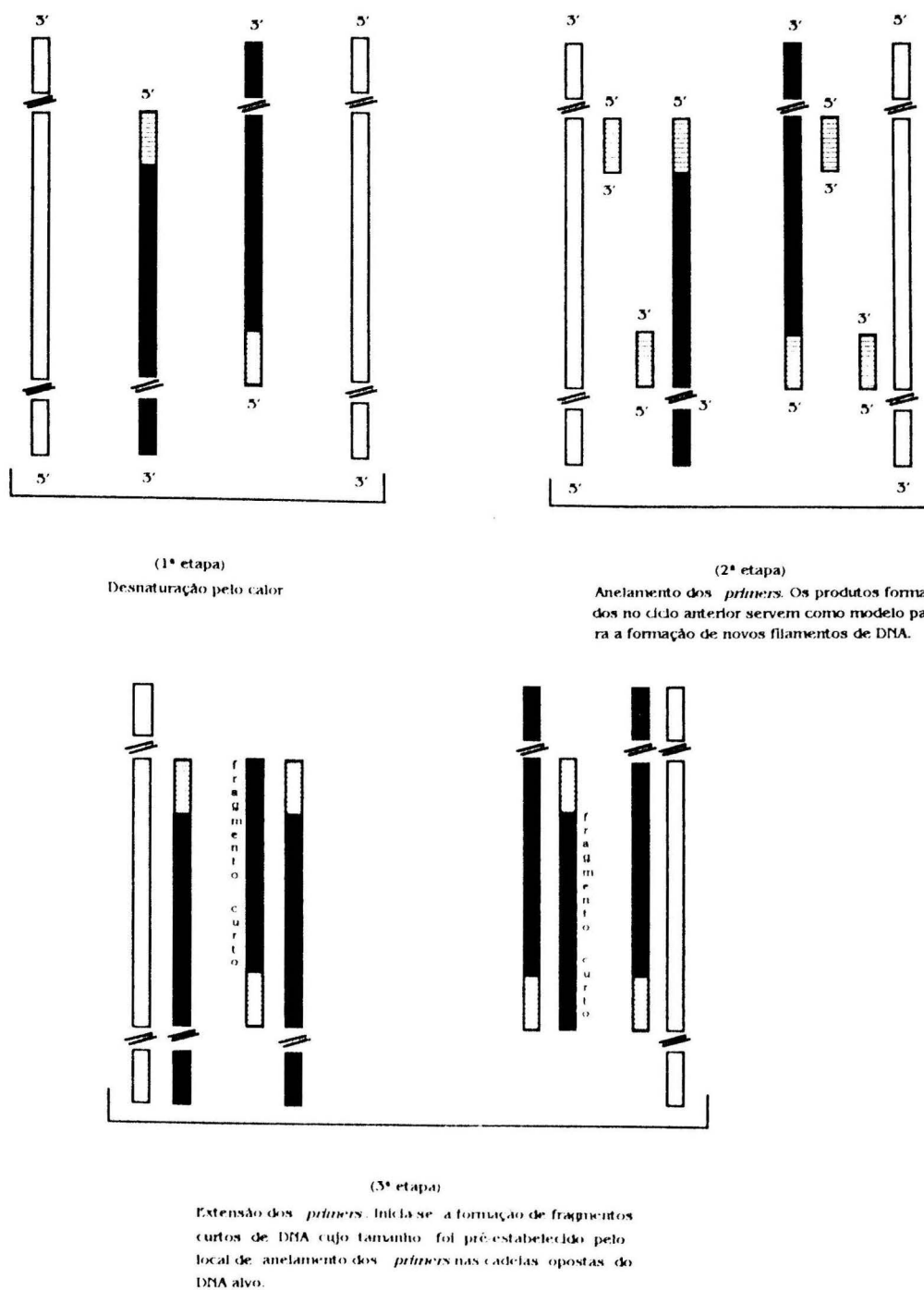


Fig. 2 - Segundo ciclo da reação em cadeia pela polimerase

Repete-se novamente o processo e, com isso, inicia-se a multiplicação de fragmentos curtos de DNA (figura 3). Os ciclos são, a seguir, repetidos por trinta a quarenta vezes.

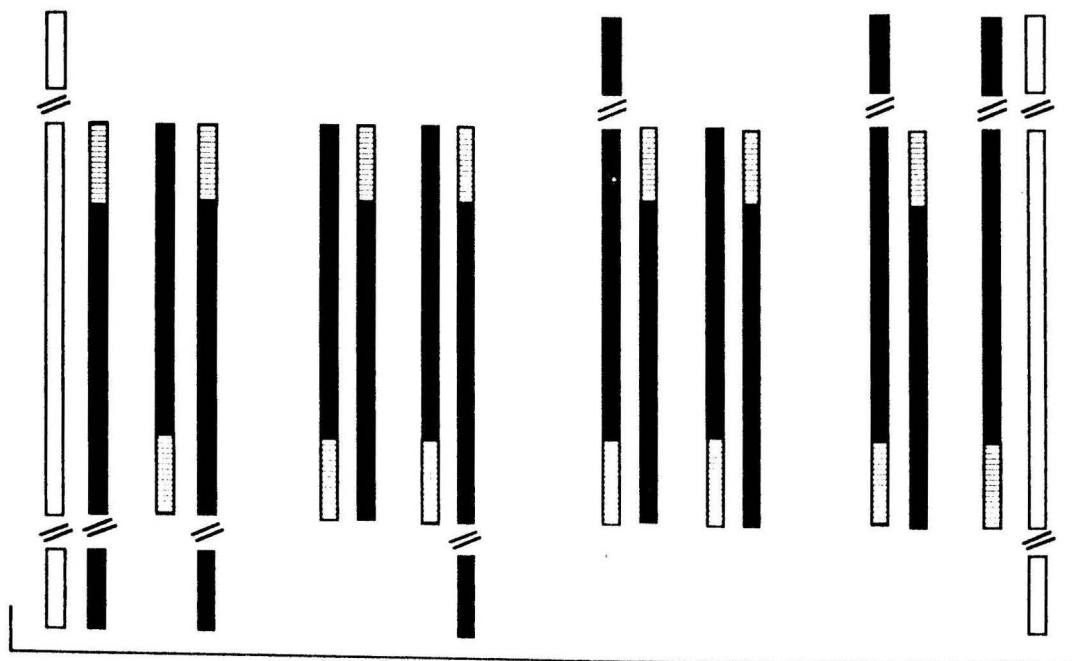


Fig. 3 - Terceiro ciclo completo da reação em cadeia pela polimerase. Começa a ocorrer a amplificação geométrica dos fragmentos curtos do DNA.

Uma característica essencial da PCR é que todos os produtos previamente sintetizados (final da terceira etapa) atuam como um modelo para novas reações de extensão dos oligonucleotídeos iniciadores em cada ciclo subsequente. O resultado desta adequadamente denominada reação em cadeia é a amplificação geométrica do DNA alvo. O material amplificado é então submetido a eletroforese, e a presença de uma banda específica do DNA alvo é identificada por visualização com luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. A particular forma de anelamento (segunda etapa do ciclo) e a amplificação geométrica (determinada por múltiplos ciclos) conferem ao método, respectivamente, altíssima especificidade e sensibilidade na detecção do DNA alvo.



### 3.2 - APLICAÇÃO DA PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

A aplicação da reação em cadeia pela polimerase no diagnóstico de doenças causadas por microorganismos inicia com a extração do DNA do agente infectante e seu posterior seqüenciamento. A próxima etapa consiste na elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* cuja seqüência deve ser específica para o DNA alvo, isto é, não pode hibridizar-se ao DNA humano ou de outros patógenos - especialmente daqueles que possam provocar uma síndrome clínica semelhante à ocasionada pelo micróbio em questão - nem ao DNA de microorganismos não patógenos que eventualmente possam estar presentes no espécime clínico que está sendo investigado. Finalmente, se realizam os experimentos clínicos.

A grande capacidade de ampliação do método torna possível uma eventual contaminação durante seu processamento no laboratório, seja por aerossol, seja por intermédio de pipetas, o que poderia levar a resultados falso-positivos. Este fato, entretanto, é superável pelo uso concomitante de controles negativos. Resultados falso-negativos, por sua vez, podem ser conferidos com a realização concomitante de controles positivos.

Alta sensibilidade e alta especificidade, associadas à relativa simplicidade de execução, qualificam a reação em cadeia pela polimerase como um método de diagnóstico microbiológico verdadeiramente promissor, e sua aplicação será particularmente importante quando os microorganismos causadores forem difíceis de identificar por microscopia ou meios de cultivo convencionais.

Um importante exemplo do uso da reação em cadeia pela polimerase com propósitos diagnósticos está na detecção do vírus da imunodeficiência humana

(HIV) em pessoas que não podem ser facilmente diagnosticadas como portadoras da infecção pelos métodos convencionais, tais como recém-nascidos de mães infectadas com HIV ou pessoas que permanecem soronegativas, mas com alta probabilidade de serem portadoras do vírus.

Na área pneumológica, o primeiro grande exemplo da aplicação do método surgiu na identificação do *Pneumocystis carinii* feita pelo *Molecular Infectious Disease Group* da Universidade de Oxford, coordenado por Ann Wakefield (111).

O quadro 1 mostra uma série de microorganismos que já podem ser identificados pela PCR.

**QUADRO 1**  
**DETECÇÃO DIAGNÓSTICA POR PCR DE MICROORGANISMOS**  
**PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA**

VÍRUS

HIV (6, 76)	Rubéola (29)
Hepatite A (47)	Citomegalovírus (17, 38)
Hepatite B (45, 51, 61)	Rotavírus (30, 37)
Hepatite C (25)	Adenovírus (2)
Herpes simples (5, 52, 73, 82)	Coxsackie (113)
Papiloma (99, 105, 114)	Poliomelite (117)
Epstein-Barr (54, 102)	

PROTOZOÁRIO, RICKETTSIA, BACTÉRIA E FUNGO

<i>Pneumocystis carinii</i> (111)	<i>Plasmodium falciparum</i> (46)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (15, 42, 98)	<i>Treponema pallidum</i> (19)
<i>Mycobacterium leprae</i> (85)	<i>Escherichia coli</i> (77)
<i>Chlamydia trachomatis</i> (72, 75, 86)	<i>Listeria monocytogenes</i> (10)
<i>Legionella pneumophila</i> (9, 100)	<i>Entamoeba histolytica</i> (69)
<i>Toxoplasma gondii</i> (3, 49)	

### 3.3 - APLICAÇÃO DA PCR EM DOENÇAS GENÉTICAS

Além do diagnóstico de moléstias infecciosas, a PCR tem se mostrado de alto valor na identificação de doenças de transmissão genética. Na área pneumológica, o método já pode ser empregado no reconhecimento de importantes patologias, como fibrose cística (07) e deficiência de alfa 1 - antitripsina (1), permitindo, inclusive, o diagnóstico pré-natal.

Em outras doenças de transmissão genética, como, por exemplo, anemia falciforme (32, 91), doença de Huntington (64), hemofilia (27, 55, 116) e distrofia muscular de Duchenne (23), a PCR igualmente permite o diagnóstico intra-útero.

### 3.4 - APLICAÇÃO DA PCR EM MEDICINA FORENSE

Na área da Medicina Forense, a PCR também tem sua aplicação, especialmente nos casos de identificação de paternidade ou de suspeita de autoria de crime.

Muitas vezes, os únicos materiais disponíveis no local do crime são pequeno volume de sangue ou de esperma, ou alguns poucos fios de cabelo. O DNA contido nesse material pode ser então amplificado e comparado com o DNA do suspeito (43, 48, 58, 59, 89).

Resumindo, o progresso na aplicação da reação em cadeia pela polimerase como uma ferramenta molecular, especialmente nas áreas aqui comentadas, tem sido extremamente rápido, e os altos graus de sensibilidade e especificidade conferem ao método uma confiabilidade ímpar no momento.

**4 - PNEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS CARINII***

---

#### 4 - PNEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS CARINII*

O *Pneumocystis carinii* foi identificado pela primeira vez em 1909, em pulmões de cobaias por Carlos Chagas (22) que, ao descrevê-lo, imaginou tratar-se de uma fase do tripanossoma. Em 1910, Antonio Carini (20) demonstrou o mesmo organismo em pulmões de ratos e, alguns anos após, Delanoe e Delanoe (26), em homenagem a este último pesquisador, denominaram-no de *Pneumocystis carinii*.

O microorganismo, que não foi isolado em meios de cultivo acelulares até o momento, foi durante muito tempo classificado como protozoário devido a suas características morfológicas e resposta terapêutica a drogas antiprotozoários. Estudos de microscopia eletrônica (40) e de biologia molecular evidenciaram a natureza fúngica do *Pneumocystis carinii* (28, 84, 110, 118). Os critérios para classificá-lo como protozoário são facilmente refutáveis.

No final da década de 30, Ammich (4) descreveu uma pneumonia que afetava crianças entre 2 e 4 meses de idade, de início insidioso e caracterizada por febre muito alta, pobres sinais auscultatórios, mas com tosse intensa, dificuldade respiratória e marcado infiltrado pulmonar difuso. A progressão para a morte devido à insuficiência respiratória ocorria em metade dos casos. As crianças avaliadas eram prematuras, sofriam de desnutrição e viviam em orfanatos. A etiologia desta infecção era desconhecida.

No início da década de 40, van der Meer e Brug (106) associaram esta forma de pneumonia com o *Pneumocystis carinii*, e Vanec (107), usando a coloração de Giemsa, encontrou esse fungo nos pulmões de crianças portadoras dessa enfermidade. Desde então, inúmeras publicações, especialmente sobre surtos

epidêmicos em várias regiões da Europa, foram publicadas e muito bem revisadas por Hopkin (44).

Nos Estados Unidos a doença foi reconhecida mais tarde, especialmente como um fenômeno esporádico em pacientes de alguma forma imunossuprimidos. Burke e colaboradores (18), em 1961, Gentry e Remington (35), em 1970, a descreveram em pacientes com hipogamaglobulinemia, enquanto Hendry e Patrick (41), em 1962, a haviam identificado em indivíduos tratados para câncer. Em 1964, Rifkind e colaboradores (88) relataram a doença em pacientes que haviam sido transplantados e, dez anos mais tarde, Walzer e colaboradores (112) observaram pneumocistose em pacientes com diversas situações de imunossupressão, especialmente leucemias e linfomas. A experiência da Clínica Mayo de 1976 e 1983 foi publicada por Peters e Prakash (80) que mostraram 53 casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, a maioria ocorrendo em portadores de leucemia submetidos a quimioterapia, ou em portadores de uma série de doenças inflamatórias tratadas com drogas imunossupressoras.

A epidemiologia desta enfermidade tomou outro rumo a partir de 1981 quando dois diferentes grupos de pesquisadores coordenados por Gottlieb (36) e Masur (62) descreveram episódios de pneumonia por *Pneumocystis carinii* associados a candidíase oral e sarcoma de Kaposi em homens jovens previamente saudáveis, aditos a drogas e/ou homossexuais. Esses achados levaram posteriormente ao reconhecimento da síndrome de imunodeficiência adquirida. Dois anos após, 2.000 casos de SIDA já haviam sido comunicados ao Centro de Controle de Doenças de Atlanta, Estados Unidos, e 40% deles haviam apresentado infecção pulmonar por *Pneumocystis carinii*.

Hoje, estima-se que 65% a 80% dos pacientes portadores de SIDA venham a desenvolver pelo menos um episódio de pneumocistose. No Rio Grande

do Sul, nos últimos anos, aproximadamente 2.000 casos de SIDA foram notificados (13) e, portanto, cerca de 1.500 episódios desta pneumonia devem ter ocorrido. Somente em 1992, 555 novos casos de SIDA foram notificados em nosso Estado (13), com uma estimativa de 400 casos novos de pneumocistose.

Nos Estados Unidos, o número de episódios de pneumonia por *Pneumocystis carinii* reconhecidos por ano aumentou de 65, em 1967, para um número estimado de 20.000 a 60.000 no início da década de 90 (63).

Esse aumento deve-se principalmente à epidemia de SIDA, mas também a outros fatores, como um maior número de pacientes submetidos a transplantes e o uso de quimioterapia mais agressiva para tumores malignos, doenças inflamatórias e imunológicas.

Aceita-se que o *Pneumocystis carinii* chega ao organismo por via inalatória, e estudos sorológicos sugerem que a maioria das pessoas já tenha sido infectada antes dos 10 anos de idade (65, 81). A infecção primária é provavelmente assintomática, e a doença somente ocorre em imunossuprimidos. Não está ainda esclarecido se a doença se deve a reinfeção endógena ou exógena, mas há alguns indícios favorecendo esta última hipótese (66). Acreditamos que, à semelhança do que ocorre com a tuberculose, por exemplo, reativação endógena ou reinfeção exógena podem ocorrer, dependendo do momento epidemiológico a maior prevalência de uma ou de outra forma de infecção.

Os sintomas mais comuns são dispnéia, tosse improdutiva e hipertermia. O radiograma do tórax mostra, na maioria das vezes, um infiltrado pulmonar difuso, mas apresentações atípicas podem ocorrer, especialmente em pacientes que fazem uso de profilaxia com pentamidina inalatória.

O tratamento de escolha da pneumocistose consiste no uso da associação de trimetoprim (20 mg/kg/dia) com sulfametoxazol (100 mg/kg/dia) durante 21 dias, enquanto a pentamidina parenteral (4 mg/kg/dia) tem sido a alternativa para os pacientes que não toleram a associação referida acima. O uso precoce de corticosteróides nos pacientes hipoxêmicos aumenta a sobrevida, mas o prognóstico continua sendo reservado.

A profilaxia é especialmente indicada nos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida que apresentem: contagem CD4 abaixo de 200 células por milímetro cúbico; febre persistente inexplicável por mais de duas semanas; candidíase oral não associada ao uso de antibióticos ou corticosteróides, ou naqueles que tenham se recuperado de um episódio de pneumonia por *Pneumocystis carinii*.



## **5 - MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 5 - MATERIAL E MÉTODOS

O lavado broncoalveolar de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida com sintomas respiratórios e que foram submetidos a broncofibroscopia diagnóstica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 21 de agosto de 1992 a 28 de maio de 1993, foi avaliado quanto à presença de *Pneumocystis carinii* utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase e as colorações da Leishman, Papanicolaou e prata-metenamina de Grocott. Trata-se de um estudo prospectivo cego.

Ao todo 78 amostras de lavado broncoalveolar foram analisadas. O grupo era constituído de 61 pacientes do sexo masculino e 17 do sexo feminino. As idades variavam de 23 a 68 anos, com uma idade média de 34 anos.

O lavado broncoalveolar foi realizado de acordo com o método previamente descrito por Crystal, Reynolds e Kalica (24). Basicamente o broncofibroscópio era introduzido até um segmento do lobo médio ou língula e um total de 120ml de solução salina era injetado, com imediata reaspiração do líquido.

Metade do material recuperado era enviado para a Unidade de Microbiologia do Hospital para realização de colorações (inclusive Grocott) e culturas de rotina do Laboratório para bactérias piogênicas, micobactérias e fungos.

A outra metade era encaminhada para o Laboratório de Citologia onde eram executadas as técnicas de Leishman e Papanicolaou e imunofluorescência para citomegalovírus, sendo que 2ml desta metade eram separados para realização da reação em cadeia pela polimerase.

A reação em cadeia pela polimerase foi realizada da seguinte forma:

## I - Extração do DNA

a) Rompimento da membrana celular e digestão das proteínas:  
Após homogeneização da amostra adicionava-se para cada 0,5 ml do lavado broncoalveolar, 10µl de 0,5M Na<sub>2</sub> EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico pH 8.0 - SIGMA), 50µl de SDS (dodecil sulfato de sódio - SIGMA) 10% e 15µl de Proteínase K (20mg/ml - SIGMA).

O material era então incubado a 50°C durante 16 horas.

b) Extração pelo fenol/clorofórmio:

A seguir, o material digerido era extraído, uma vez com fenol redistilado e tamponado com Tris (hidroximetilaminometano) 10mM e Na<sub>2</sub> EDTA - 1mM pH 8.0 e outra vez com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

c) Precipitação do DNA:

O DNA contido na amostra era então precipitado, adicionando-se 50µl de acetato de sódio 3M pH 5.6, 3µl de tRNA (5mg/ml) e 600µl de isopropanol e incubando-se durante 4 horas a 20°C negativos. Após, o DNA era sedimentado por centrifugação, 10Krev/minuto, e o sedimento era lavado uma vez com etanol 70% a 4°C. Posteriormente ressuspensia-se o DNA em 10µl de água bidestilada estéril.

## II - Amplificação do DNA

O termociclador usado para amplificação de DNA era da marca Perkin-Elmer/Cetus.

O DNA do *Pneumocystis carinii* foi amplificado, empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores pAZ 102-E e pAZ 102-H sintetizados e cedidos por Ann Wakefield, do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Oxford, e que apresentavam, respectivamente, as seqüências: - 5' - GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA - 3' - e - 5' - GTC TAC GTT GCA AAG TAC TC - 3' -. Os produtos da amplificação constituíam-se de fragmentos curtos de DNA, com uma seqüência de 346 pares de bases. Utilizou-se a técnica de Saiki e colaboradores (92) modificada, descrita a seguir:

a) Preparação da mistura-mestre:

A solução necessária para amplificação chamou-se de mistura mestre e era preparada em múltiplos de 48µl como segue:

- Soro Albumina Bovina (BSA, Sigma) 8mg/ml: 3µl.
- Água Tridestilada estéril: 30,5µl.
- Tampão específico para a Taq polimerase (10X KCl, 500nM; MgCl<sub>2</sub>, 15 mM; Tris - HCl pH 8.13; gelatina 0,1%): 5µl.
- Polimerase da bacteria *Thermus aquaticus* (Taq-polimerase Cenbiot) - 5 u/µl: 0,5µl.
- Mistura equimolar dos nucleotídeos trifosfatados: dATP, dTTP, dCTP e dGTP, solução a 2,5 mM: 5µl.
- Oligonucleotídeo iniciador pAZ 102-E: 2µl
- Oligonucleotídeo iniciador pAZ 102-H: 2µl

b) Preparação da amostra a ser amplificada e dos controles negativo e positivo:

Misturavam-se 2 $\mu$ l do DNA extraído com 48 $\mu$ l da mistura-mestre usando-se tubo capilar descartável para evitar contaminação.

Como controle negativo utilizavam-se 2 $\mu$ l de água bidestilada adicionada a 48 $\mu$ l da mistura-mestre em outro tubo de PCR.

Como controle positivo utilizavam-se 2 $\mu$ l de uma solução com DNA clonado de *Pneumocystis carinii* de rato, adicionada a 48 $\mu$ l da mistura-mestre em outro tubo de PCR, como última amostra da série, de modo a evitar contaminação.

Após, em cada tubo de PCR adicionavam-se 50 $\mu$ l de óleo mineral para cobrir as soluções e evitar evaporação durante os ciclos de amplificação.

c) Ciclos de amplificação:

As amostras preparadas com os respectivos controles negativo e positivo eram colocadas no termociclador e submetidas a 40 ciclos. Cada ciclo consistia de desnaturação a 94°C durante 60 segundos, anelamento a 55°C durante 60 segundos e extensão dos *primers* pela Taq polimerase a 72°C durante 120 segundos.

Após término do último ciclo, as amostras eram refrigeradas e os tubos retirados do termociclador.

A seguir colocavam-se 10 $\mu$ l do produto final da reação em tubos com 2 $\mu$ l de tampão (0,002% glicerol 20% + Tris 10mM - EDTA 1mM pH 8.0) com bromofenol.

d) Eletroforese:

Separavam-se 10µl da solução resultante que eram colocadas nas respectivas canaletas do gel de agarose (SIGMA) 1%, contendo 2µg/ml de brometo de etídio (SIGMA).

O tampão de corrida era o TBE (Tris - HCl 89mM, ácido bórico 89mM Na<sub>2</sub> EDTA - 2mM - pH 8.3).

Adicionavam-se 5µl de marcador de peso molecular (DNA do bacteriófago lambda clivado com as enzimas de restrição Eco-RI e Hind III) nas cavidades do gel em ambos os lados das amostras a serem testadas.

A eletroforese era realizada em 100 volts e 60 mA com duração de aproximadamente 30 minutos.

Finalmente o gel era fotografado sob luz ultravioleta, utilizando-se filme polaroide tipo 667 de alta resolução (3.000 asa/36 DIN)

As amostras positivas produziam uma banda visível na altura correspondente a 346 pares de bases.

As colorações de Leishman, Papanicolaou e Grocott não serão detalhadas por serem por demais conhecidas. Para maiores informações sugerimos o "Manual de Rotinas" na Unidade de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Com os resultados obtidos se construíram tabelas de contingência 2x2, para determinação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos, teste de  $\chi^2$  com correção de Yates e intervalos de confiança. Escolheu-se um nível de significância  $p < 0,05$ .

## **6 - RESULTADOS**

---

## 6 - RESULTADOS

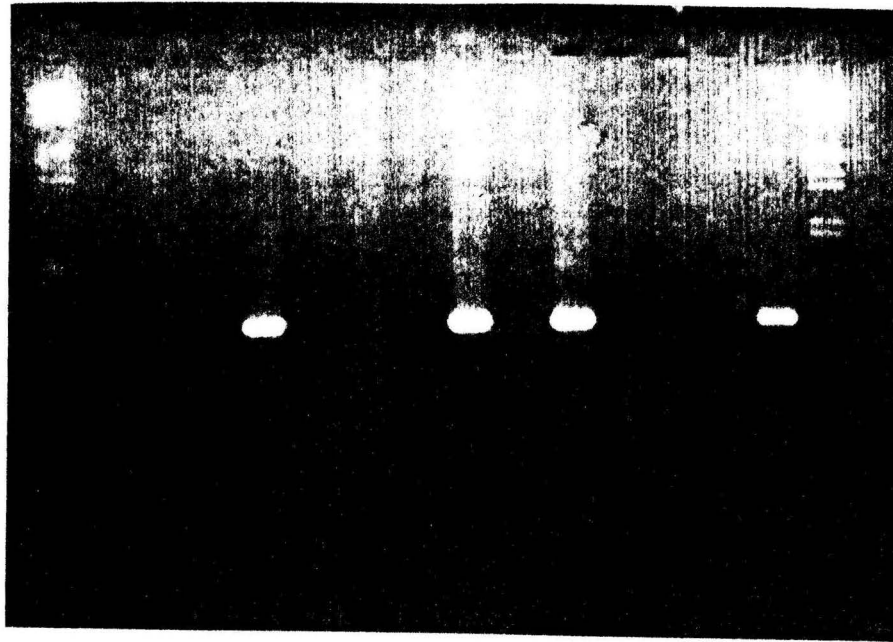
De um total de 78 amostras de lavado broncoalveolar colhido com finalidade diagnóstica de pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida com sintomas respiratórios, 17 foram positivas e 61 negativas para *Pneumocystis carinii* através da amplificação de fragmentos de DNA pela técnica da PCR.

Considerando-se como critério diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis carinii* uma reação positiva de amplificação de DNA pela PCR, a prevalência dessa enfermidade no grupo estudado foi de 21,8%.

As reações de amplificação do DNA de *Pneumocystis carinii* são mostradas nas figuras de 4 a 13. As amostras de números 32 e 56 foram, inicialmente, duvidosas quanto à amplificação, e por isso foram repetidas, fazendo-se nova extração de DNA e novo processo de amplificação. A amostra do paciente número 32 teve amplificação confirmada como positiva, e a do paciente número 56 teve amplificação negativa.



A B C D E F G H I J L M N O P Q



**Fig. 4 -** Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	paciente nº 1	amplificação negativa
D	paciente nº 2	amplificação negativa
E	paciente nº 3	amplificação positiva
F	paciente nº 4	amplificação negativa
G	paciente nº 5	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 6	amplificação positiva
J	paciente nº 12	amplificação negativa
L	paciente nº 13	amplificação positiva
M	paciente nº 14	amplificação negativa
N	paciente nº 15	amplificação negativa
O	controle negativo	amplificação negativa
P	controle positivo	amplificação positiva
Q	marcador de peso molecular	

A B C D E F G H I J L M N O P Q

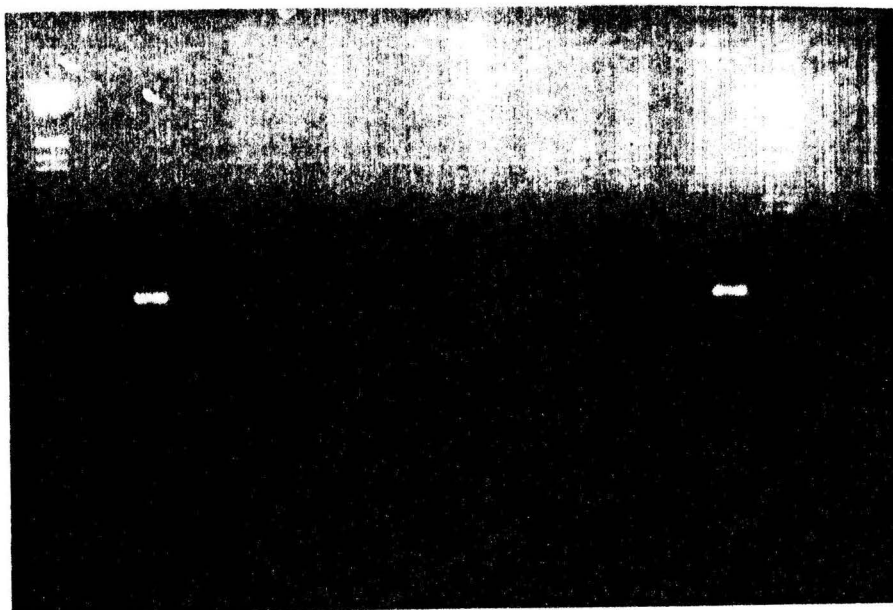


Fig. 5 - Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	paciente nº 16	amplificação positiva
D	paciente nº 17	amplificação negativa
E	paciente nº 18	amplificação negativa
F	paciente nº 28	amplificação negativa
G	paciente nº 29	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 30	amplificação negativa
J	paciente nº 31	amplificação negativa
L	paciente nº 32	amplificação duvidosa
M	paciente nº 33	amplificação negativa
N	controle negativo	amplificação negativa
O	controle negativo	amplificação negativa
P	controle positivo	amplificação positiva
Q	marcador de peso molecular	

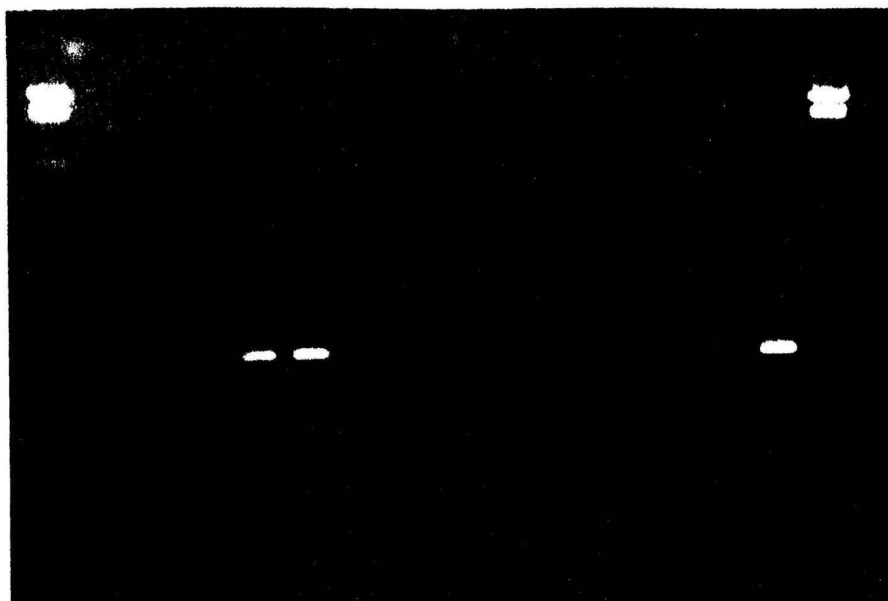


Fig. 6 - Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	controle negativo	amplificação negativa
D	paciente nº 34	amplificação negativa
E	paciente nº 35	amplificação positiva
F	paciente nº 36	amplificação positiva
G	paciente nº 37	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 38	amplificação negativa
J	paciente nº 39	amplificação negativa
L	paciente nº 40	amplificação negativa
M	paciente nº 41	amplificação negativa
N	paciente nº 42	amplificação negativa
O	controle negativo	amplificação negativa
P	controle negativo	amplificação positiva
Q	marcador de peso molecular	

A B C D E F G H I J L M N O P Q

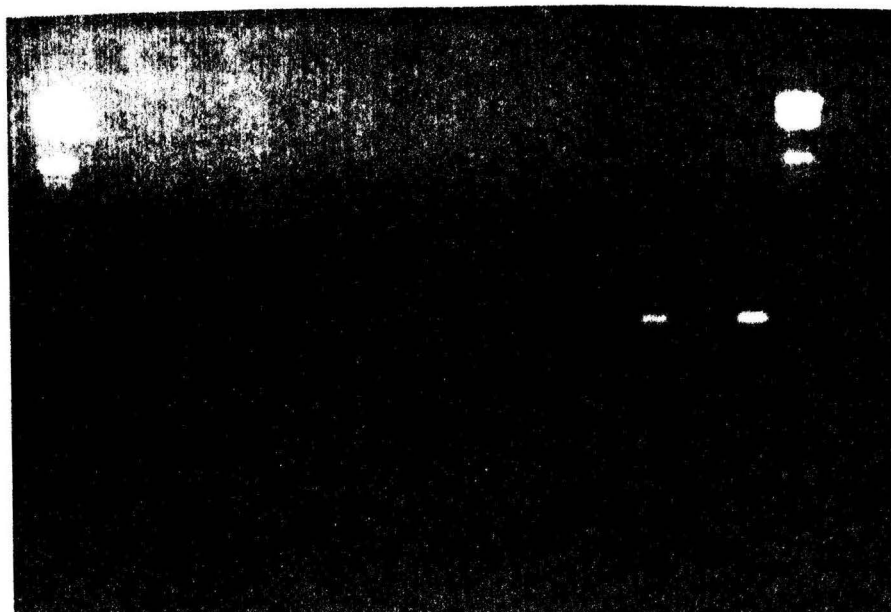


Fig. 7 - Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	paciente nº 7	amplificação negativa
D	paciente nº 8	amplificação negativa
E	paciente nº 9	amplificação negativa
F	paciente nº 10	amplificação negativa
G	paciente nº 11	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 19	amplificação negativa
J	paciente nº 20	amplificação negativa
L	paciente nº 21	amplificação negativa
M	paciente nº 22	amplificação negativa
N	paciente nº 23	amplificação positiva
O	controle negativo	amplificação negativa
P	controle positivo	amplificação positiva
Q	marcador de peso molecular	

A B C D E F G H I J L M N O P Q

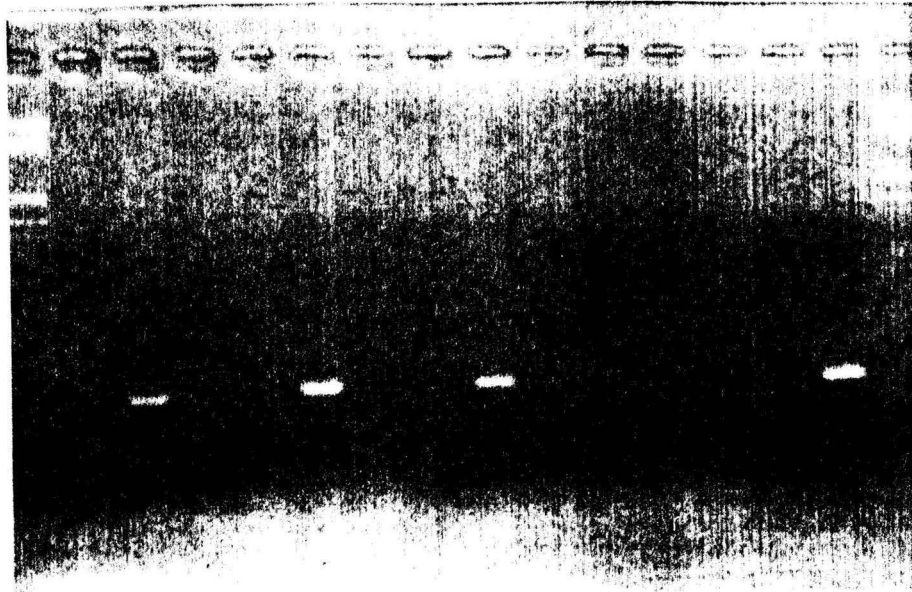


Fig. 8 - Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	controle positivo	amplificação positiva
D	paciente nº 24	amplificação negativa
E	paciente nº 25	amplificação negativa
F	paciente nº 26	amplificação positiva
G	paciente nº 27	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 43	amplificação positiva
J	paciente nº 44	amplificação negativa
L	paciente nº 45	amplificação negativa
M	paciente nº 46	amplificação negativa
N	paciente nº 47	amplificação negativa
O	controle negativo	amplificação negativa
P	controle positivo	amplificação positiva
Q	marcador de peso molecular	

A B C D E F G H I J L M N O P Q

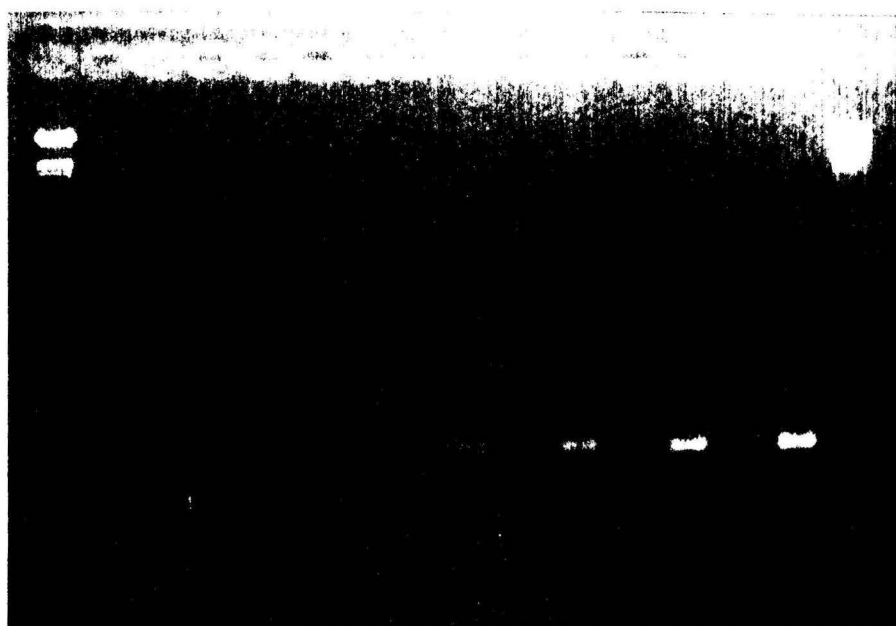


Fig. 9 - Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	paciente nº 48	amplificação negativa
D	paciente nº 49	amplificação negativa
E	paciente nº 50	amplificação negativa
F	paciente nº 51	amplificação negativa
G	paciente nº 52	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 53	amplificação positiva
J	paciente nº 54	amplificação negativa
L	paciente nº 55	amplificação positiva
M	paciente nº 56	amplificação duvidosa
N	paciente nº 57	amplificação positiva
O	controle negativo	amplificação negativa
P	controle positivo	amplificação positiva
Q	marcador de peso molecular	

A B C D E F G H I J L M N O P Q

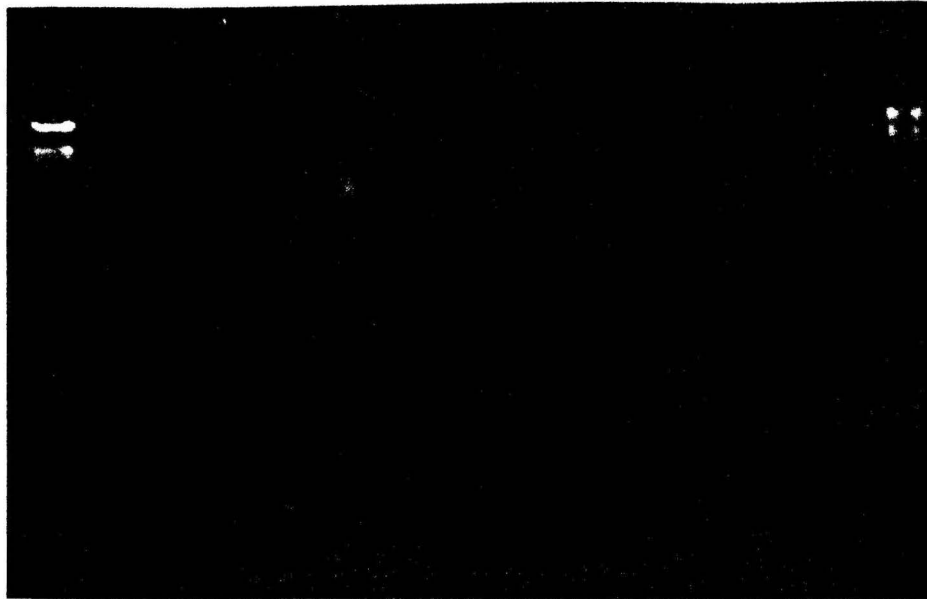


Fig. 10 - Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	paciente nº 58	amplificação positiva
D	paciente nº 59	amplificação negativa
E	paciente nº 71	amplificação negativa
F	paciente nº 72	amplificação negativa
G	paciente nº 73	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 74	amplificação negativa
J	paciente nº 75	amplificação negativa
L	paciente nº 76	amplificação negativa
M	paciente nº 77	amplificação positiva
N	paciente nº 78	amplificação negativa
O	controle negativo	amplificação negativa
P	controle positivo	amplificação positiva
Q	marcador de peso molecular	



**Fig. 11** -Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	paciente nº 60	amplificação negativa
D	paciente nº 61	amplificação negativa
E	controle negativo	amplificação negativa
F	paciente nº 62	amplificação negativa
G	controle negativo nº 63	amplificação negativa
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 64	amplificação negativa
J	paciente nº 65	amplificação negativa
L	controle negativo	amplificação negativa
M	controle positivo	amplificação positiva
N	marcador de peso molecular	



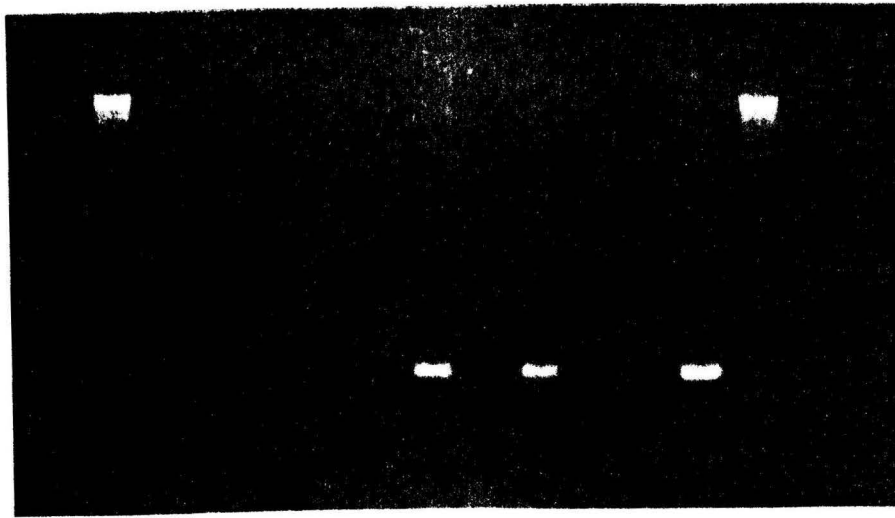
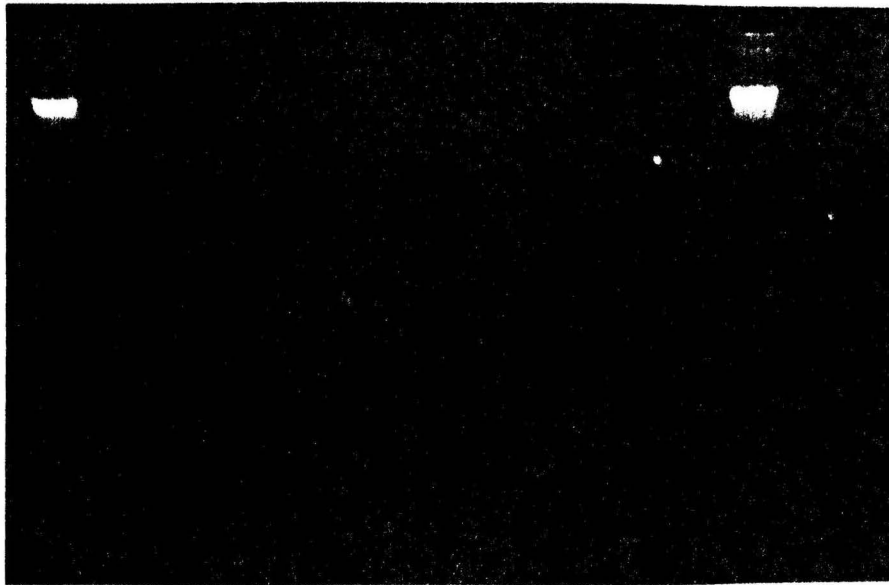


Fig. 12 -Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

CANALETAS	AMOSTRAS	RESULTADO
A	marcador de peso molecular	
B	controle negativo	amplificação negativa
C	paciente nº 66	amplificação negativa
D	paciente nº 67	amplificação negativa
E	controle negativo	amplificação negativa
F	paciente nº 68	amplificação negativa
G	paciente nº 69	amplificação positiva
H	controle negativo	amplificação negativa
I	paciente nº 70	amplificação positiva
J	paciente nº 56	amplificação negativa
L	controle negativo	amplificação negativa
M	controle positivo	amplificação positiva
N	marcador de peso molecular	

**A****B****C****D**

**Fig. 13** - Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação pela PCR

<b>CANALETAS</b>	<b>AMOSTRAS</b>	<b>RESULTADO</b>
A	marcador de peso molecular	
B	paciente nº 56	amplificação negativa
C	paciente nº 32	amplificação positiva
D	marcador de peso molecular	

As colorações citológicas de Leishman e Papanicolaou foram positivas em 13 amostras e negativas em 65 (tabela I). As 13 amostras positivas pelas colorações citológicas também foram positivas pela PCR. Houve, portanto, 4 amostras negativas pelas colorações citológicas e positivas pela PCR.

A concordância entre os métodos citológicos e PCR foi de 94,9% (74 de 78 casos).

A sensibilidade das colorações citológicas foi de 76,5% (13 de 17 casos), e a especificidade, de 100%.

**TABELA I**

**CORRELAÇÃO ENTRE AS COLORAÇÕES CITOLÓGICAS DE LEISHMAN E PAPANICOLAOU E A PCR NA IDENTIFICAÇÃO DE *PNEUMOCYSTIS CARINII***

COLORAÇÕES	PCR		
	POSITIVA	NEGATIVA	TOTAL
Leishman e Papanicolaou positivas	13	00	13
Leishman e Papanicolaou negativas	04	61	65
TOTAL	17	61	78

Sensibilidade: 76,5%  
 Especificidade: 100%  
 Valor preditivo positivo: 100%  
 Valor preditivo negativo: 78,2%  
 Acurácia: 94,9%  
 $\chi^2$  corrigido: 50,6     $p < 0,001$

Intervalo de confiança (95%): 68% a 84%

A coloração pela prata de Grocott foi positiva em 9 amostras e negativa em 69 (tabela II).

A concordância entre a coloração de Grocott e a PCR foi de 89,7% (70/78 casos).

A sensibilidade da coloração de Grocott foi de 52,9% (09/17 casos), e a especificidade, de 100%.

**TABELA II**

**CORRELAÇÃO ENTRE A COLORAÇÃO PELA PRATA DE GROCOTT E A PCR**

COLORAÇÃO	PCR		
	POSITIVA	NEGATIVA	TOTAL
Prata de Grocott positiva	09	00	09
Prata de Grocott negativa	08	61	69
TOTAL	17	61	78

Sensibilidade: 52,9%

Especificidade: 100%

Valor preditivo positivo: 100%

Valor preditivo negativo: 87,1%

Acurácia: 89,7%

$\chi^2 = 31,5$        $p < 0,001$

Intervalo de confiança (95%): 42% a 64%

## **7 - DISCUSSÃO**

---

## 7 - DISCUSSÃO

A pneumonia por *Pneumocystis carinii* pode ser considerada como um indicador de imunossupressão, e sua prevalência tem aumentado significativamente na última década, acompanhando o aumento na prevalência de portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida. Existem evidências de que 65% a 80% dos pacientes com SIDA apresentarão durante sua vida pelo menos um episódio de pneumonia por *Pneumocystis carinii* (21, 71).

No Rio Grande do Sul, o número de notificações de casos de SIDA no período compreendido entre janeiro de 1983 e março de 1993 foi de 1.931 casos. Nesse mesmo período, o total de óbitos conhecidos devido a essa síndrome foi de 1.137 casos, o que representa uma taxa de letalidade de 59,15% (13).

Com base nesses dados, estima-se que aproximadamente 1.500 episódios de pneumonia por *Pneumocystis carinii* tenham ocorrido em nosso Estado, nos últimos 10 anos, em pacientes com SIDA, sem considerar-se um grande número de doentes não notificados.

É possível que o aumento na prevalência de pneumonia por *Pneumocystis carinii* venha a sofrer uma desaceleração devido ao uso mais freqüente de profilaxia com pentamidina ou associação trimetoprim-sulfametoxazol, mas a maior sobrevida dos pacientes imunossuprimidos, bem como o contínuo aumento do número de casos de SIDA indicam tendência contrária.

Escolhemos como espécime clínico, em nosso estudo, o lavado broncoalveolar colhido por broncofibroscopia devido a seu ótimo rendimento em pacientes imunossuprimidos, associado a baixos índices de morbidez (16, 39).

A biópsia pulmonar a céu aberto pouco acrescenta aos resultados das broncofibroscopias quando se trata de doença infecciosa em imunodeficientes e aumenta consideravelmente a morbidez (115).

Além disso, a broncofibroscopia é capaz de identificar uma afecção relativamente freqüente no pulmão de pacientes portadores de SIDA - o sarcoma de Kaposi - que muitas vezes se assemelha ao quadro clínico e radiológico de algumas doenças infecciosas, e que não pode ser identificada pelo exame de escarro.

O escarro como espécime clínico, embora não implique qualquer morbidez, apresenta duas desvantagens: baixa sensibilidade quando se utilizam as técnicas convencionais e dificuldade de ser obtido nos casos de pneumonias intersticiais. A indução na obtenção de escarro utilizando nebulizações com cloreto de sódio hipertônico tem ajudado a minimizar a segunda desvantagem. Usando coloração de Giemsa no escarro obtido por indução com nebulizações com cloreto de sódio hipertônico em pacientes com SIDA, Bigby e colaboradores (11) encontraram o *Pneumocystis carinii* em 56% dos casos com pneumonia comprovadamente devida a esse fungo e deixaram de incluir no estudo 9 de 43 pacientes nos quais não foi possível obter o espécime clínico.

Sensibilidade semelhante no escarro (55%), colhido após indução com cloreto de sódio a 5% pelas técnicas de Grocott e Papanicolaou na identificação de *Pneumocystis carinii* foi obtida por Pitchenik e colaboradores (83). Não ocorreram exames falso-positivos.

Em nossa pesquisa, avaliamos 78 pacientes com sintomas respiratórios, portadores de SIDA, que necessitaram ser submetidos a broncoscopia diagnóstica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 21 de agosto de 1992 a 28 de maio de 1993.

O lavado broncoalveolar destes pacientes foi avaliado quanto à presença de *Pneumocystis carinii*, usando-se as colorações rotineiras de Leishman, Papanicolaou e Grocott e comparando-as com a reação em cadeia pela polimerase. Não tínhamos conhecimento do quadro clínico dos pacientes nem dos resultados das colorações rotineiras quando da realização da PCR.

Na amostra estudada encontramos uma amplificação positiva para DNA de *Pneumocystis carinii* em 17 casos (21,8%), ao passo que os resultados obtidos com pelo menos uma das colorações rotineiras foram positivos em 13 desses e negativos nos demais.

As reações de amplificação de DNA que foram positivas mostraram, exceto uma, forte banda no gel de agarose na altura correspondente a 346 pares de bases, conforme está reproduzido nas figuras de 4 a 12. Apenas 1 caso de amplificação positiva, o de número 32, apresentou uma banda fraca na mesma altura (figura 5). Este paciente estava recebendo tratamento com associação trimetoprim-sulfametoxazol já há 7 dias quando da colheita do lavado broncoalveolar. Muito provavelmente, portanto, restava ainda uma quantidade muito pequena de *Pneumocystis carinii* em seus pulmões, mas suficiente para ser detectada pela PCR. A análise desta amostra foi repetida e confirmou sua positividade com uma banda de fraca intensidade (figura 13).

Entre as amostras cujas amplificações foram negativas houve apenas uma que inicialmente produziu uma banda de fraca intensidade ao ser fotografado o



gel de agarose sob luz ultra-violeta (amostra número 56, figura 9). A análise desta amostra foi realizada novamente e mostrou-se negativa. Provavelmente ocorreu, de início, uma contaminação no momento da realização da eletroforese, uma vez que as amostras de número 55 e número 57 que a antecediam e a sucediam respectivamente eram reações de amplificação positiva.

Inicialmente, quando os resultados foram decodificados e comparados, havia 12 casos positivos pelas colorações rotineiras e 17 positivos pela PCR. Os 5 casos discordantes foram repetidos pela PCR e confirmados, enquanto as lâminas das colorações rotineiras foram revisadas e em um caso o diagnóstico foi modificado de negativo para positivo (erro de leitura na avaliação inicial).

A concordância, portanto, da PCR com as colorações rotineiras foi de 94,9% (74 de 78 casos) e, se considerarmos todos os casos de PCR positivos como verdadeiramente positivos ou padrão-áureo, a sensibilidade das colorações rotineiras foi de 76,5%, conforme tabela I.

Os prontuários dos 4 pacientes cujos resultados divergiram foram minuciosamente examinados, e serão discutidos a seguir.

Os casos números 43 e 55 tinham evidências clínicas e radiológicas altamente sugestivas de pneumonia por *Pneumocystis carinii*: tosse, dispnéia, hipertermia e infiltrado pulmonar difuso. Receberam tratamento com trimetoprim-sulfametoxazol e evoluíram favoravelmente, pelo que concluímos como sendo verdadeiros os resultados positivos da PCR.

O caso número 32, que apresentava infiltrado no pulmão direito e sintomas de tosse, dispnéia e hipertemia, recebeu tratamento por 21 dias com associação trimetoprim-sulfametoxazol mas evoluiu para óbito. O lavado broncoal-

veolar realizado no 7º dia desse tratamento tinha mostrado *Mycobacterium tuberculosis* na cultura. A necrópsia revelou granulomas com pesquisa de BAAR positiva no baço e fígado, e no pulmão encontraram-se células de inclusão citomegálica. A pesquisa de *Pneumocystis carinii* pela coloração de Grocott foi negativa. Como o paciente havia sido tratado adequadamente para pneumocistose, concluímos que no momento da broncoscopia o paciente muito provavelmente apresentava as duas infecções, tuberculose e pneumocistose. Ressalta-se que esse paciente é o mesmo que apresentou a única amplificação positiva com banda fraca como já comentamos previamente.

Finalmente, o caso de número 53 apresentava na ocasião da realização da broncoscopia tosse, e radiograma de tórax com infiltrado pulmonar difuso e foi tratado com tuberculostáticos, sem comprovação bacteriológica de tuberculose. Teve alta hospitalar, recebeu dose profilática de trimetoprim-sulfametoxazol por 21 dias, mas não evoluiu bem, vindo a falecer cinco meses após devido a hemorragia digestiva. Próximo ao óbito, apresentava comprovadamente histoplasmose, toxoplasmose e criptococose. Provavelmente a quantidade de quimioterápicos recebida, embora em doses consideradas profiláticas, tenha sido suficiente para interromper a evolução clínica da infecção pulmonar por *Pneumocystis carinii*, detectada pela PCR. Não dispomos, no entanto, de elementos suficientes para concluir com segurança que se tratava de pneumonia por *Pneumocystis carinii* no momento da realização da broncofibroscopia.

As amostras que tiveram amplificação positiva do DNA de *Pneumocystis carinii* foram encaminhadas ao Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Oxford para que o sequenciamento deste DNA fosse obtido. Segundo informações pessoais fornecidas por Ann Wakefield, que realizou o processo, o DNA por nós identificado mostrou seqüência semelhante ao DNA do

*Pneumocystis carinii* encontrado na Inglaterra e na África. Estes achados serão em breve motivo de uma publicação conjunta.

Em nosso estudo, os resultados obtidos com a coloração de Grocott foram aquém do esperado. Como possível explicação apontamos o fato de que a rotina deste método no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sofreu várias alterações, inclusive com mudanças dos técnicos responsáveis. Além disso, sabemos que a sensibilidade desse método diminui quando a apresentação dos sintomas é precoce (39) ou quando os pacientes fazem uso prévio de profilaxia da pneumonia por *Pneumocystis carinii* com pentamidina ou associação trimetopim-sulfametoxazol (50). No trabalho realizado por Tregnago (103) a coloração de Grocott foi feita artesanalmente pelo Laboratório de Citologia do HCPA e houve concordância de 100% dessa coloração com as colorações citológicas de Leishman e de Papanicolaou. A sensibilidade dos métodos rotineiros encontrada por esse autor no diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis carinii* no lavado broncoalveolar foi de 90%, a mesma registrada por Broaddus e colaboradores (16). Por motivos alheios ao nosso controle, o Laboratório de Citologia não pode realizar a técnica de Grocott em nossa série.

Muitas vezes, devido à falta de procedimento diagnóstico suficientemente sensível e específico, a decisão de iniciar-se a terapêutica para uma pneumonia cujo agente etiológico suspeita-se ser o *Pneumocystis carinii*, é baseada apenas na apresentação clínica e radiológica. Tal conduta leva, com freqüência, ao emprego exagerado de drogas potencialmente tóxicas, como trimetoprim-sulfametoxazol ou pentamidina. Isso é particularmente importante no caso de pneumonia intersticial não específica ou de pneumonia linfocítica que ocorrem nos imunodeficientes e que têm apresentação clínica e radiológica idêntica à da pneumonia por *Pneumocystis carinii*, exceto pelo fato de regredirem sem terapêutica específica (101), ou no caso da pneumonia por citomegalovírus, que clínica e radiologicamente

pode ser indistinguível da pneumocistose pulmonar. Esta mesma falta de um método diagnóstico totalmente confiável faz com que se deixe de diagnosticar a pneumonia por *Pneumocystis carinii* quando ela se apresenta com aspectos radiológicos atípicos, como pode acontecer em pacientes que fazem uso profilático de pentamidina (50), ou quando ela simula outras enfermidades também freqüentes no imunodeprimido, como, por exemplo, a tuberculose (68). Miller e colaboradores (67) descreveram 21 pacientes portadores de SIDA com estudos radiológicos considerados não típicos de infecção pulmonar por *Pneumocystis carinii*, nos quais esse agente etiológico foi comprovadamente identificado.

Como já mencionado previamente, a PCR associa duas qualidades importantíssimas para um método diagnóstico: alta sensibilidade e alta especificidade. A alta sensibilidade é obtida devido à amplificação geométrica de fragmentos de DNA contidos na amostra clínica após 30 a 40 ciclos de duplicação, enquanto a alta especificidade se deve ao fato de a ampliação só acontecer quando estiver presente uma determinada seqüência de nucleotídeos que é exclusiva da espécie do microorganismo que está sendo pesquisado.

O uso da reação em cadeia pela polimerase, como método de diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, iniciou com a clonagem do DNA desse fungo e subsequente síntese de oligonucleotídeos iniciadores por Wakefield e colaboradores (109). Estes oligonucleotídeos se mostraram eficientes para amplificação de DNA do *Pneumocystis carinii* de pulmões de ratos infectados com o fungo, sem amplificar outros microorganismos presentes, como *Aspergillus nidulans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, estes oligonucleotídeos, denominados pAZ 102-E e pAZ 102-H, foram testados como iniciadores da reação de amplificação de DNA no lavado broncoalveolar de 47 broncofibroscopias diagnósticas (111). Destes 47 exames, 10 foram realizados em pacientes

imunocompetentes como controle, e foram negativos na tentativa de amplificar DNA do *Pneumocystis carinii*. As outras 37 broncofibroscopias foram realizadas em pacientes imunodeficientes. Os autores encontraram coloração da prata positiva em 16 pacientes que responderam ao tratamento com pentamidina ou associação trimetoprim-sulfametoxazol. Esses mesmos pacientes tiveram reação positiva pela PCR. A coloração pela prata foi negativa, em outros 6 pacientes, que também responderam ao tratamento, e em 4 desses a PCR foi positiva. Finalmente em 15 pacientes não houve resposta ao tratamento, e ambos os métodos de diagnóstico foram negativos. Portanto, em 20 casos com suspeita clínica de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, com resposta terapêutica favorável e positivos pela PCR, 16 foram positivos pela coloração da prata, o que conferiu a este último método uma sensibilidade de 80%. Os dois casos com suspeita clínica e resposta terapêutica favorável, mas negativos por ambos os métodos, foram considerados pelos autores como tendo outra etiologia, fazendo referências a entidades como pneumonia não específica ou pneumonia linfocítica, que são discutidas por Suffredini e colaboradores (101).

Os estudos de Wakefield e colaboradores (111) mostraram, pela primeira vez, que a amplificação de DNA pela PCR é um método altamente sensível e específico na identificação de *Pneumocystis carinii* quando empregado em amostras de lavado broncoalveolar.

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Oxford publicou sua experiência com a utilização da PCR no diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis carinii* em pacientes portadores de SIDA, tendo como espécime clínico o escarro (108). De um total de 20 pacientes com diagnóstico clínico de pneumocistose pulmonar, 18 tiveram PCR positiva, ao passo que, de 44 pacientes com outros diagnósticos clínicos, a PCR foi positiva em apenas um deles. Esse paciente estava recebendo

profilaxia com dapsona e 10 semanas mais tarde apresentou episódio bem documentado de pneumonia por *Pneumocystis carinii*. No mesmo estudo a coloração pela prata foi positiva, no escarro, em apenas 7 dos 20 casos. Esta grande sensibilidade verificada com a PCR no escarro anula uma das desvantagens com este espécime clínico e poderá talvez fazer com que o escarro venha a ser usado antes da colheita do lavado broncoalveolar. A broncofibroscopia, embora de grande utilidade e baixo risco, pode ser causadora de desconforto ao paciente, além de ser um procedimento de custo relativamente elevado.

Em trabalho mais recente, Peters, Wakefield e colaboradores (79) empregaram a técnica da PCR em pulmões de indivíduos não imunodeficientes com idade entre 15 e 70 anos e submetidos a necrópsia. *Pneumocystis carinii* não foi detectado em nenhuma das 45 reações de amplificação de DNA, o que, uma vez mais, comprovou a alta especificidade do método.

A reação em cadeia pela polimerase foi também analisada pelo mesmo grupo (57) no escarro de pacientes que haviam sido submetidos a transplantes de rim ou de coração-pulmão e comparada com a técnica de imunofluorescência, com anticorpos monoclonais contra *Pneumocystis carinii*, tendo se mostrado mais sensível. Nesse mesmo estudo verificou-se que infecção subclínica ou colonização de *Pneumocystis carinii* pode ocorrer em pacientes imunodeficientes, organotransplantados assintomáticos, isto porque o *Pneumocystis carinii* foi detectado no escarro de alguns desses indivíduos sem evidências clínicas de infecção por esse fungo no momento do exame, mas que vieram a desenvolver a pneumonia semanas após. Estes achados de *Pneumocystis carinii*, precedendo doença clínica, colonizantes nunca ocorreram no grupo controle que consistia de pacientes imunocompetentes.

Na seqüência das investigações, a PCR foi estudada quanto à sua capacidade quantitativa de detecção. Peters e colaboradores (78) constataram que 100 microorganismos em uma amostra são suficientes para serem identificados quando o DNA é amplificado pela PCR e visualizado por eletroforese em gel de agarose e corado por brometo de etídio, como realizamos em nosso estudo.

O poder de detecção do método pode ser ainda aumentado quando se acrescenta outro oligonucleotídeo após a realização de amplificação do DNA, o que constitui a técnica conhecida como hibridização de Southern. Por esse método, quantidades tão pequenas quanto um ou dois microorganismos na amostra podem ser detectadas (78).

Reddy e colaboradores (87), por sua vez, mostraram que a amplificação do DNA do *Pneumocystis carinii* e sua detecção por eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio pode detectar 200 microorganismos e, quando a hibridização de Southern é acrescentada, 20 microorganismos são suficientes para tornar a reação positiva.

Esta maior capacidade de detecção quando se acrescenta o Southern permitiria, inclusive, a identificação de colonizações ou de infecções subclínicas em pacientes imunossuprimidos (57, 111).

A PCR tem sido comparada com métodos convencionais de identificação de *Pneumocystis carinii* - Grocott, Giemsa, Leishman, Papanicolaou - e com uma técnica mais recente, a imunofluorescência com anticorpos monoclonais, sintetizados contra antígenos do *Pneumocystis carinii*. A seguir discutiremos alguns desses trabalhos.

Em estudo recente com 28 pacientes portadores de SIDA, com sintomas respiratórios, a PCR mostrou-se  $10^4$  a  $10^6$  vezes mais sensível em relação ao número de microorganismos detectados do que a imunofluorescência (56).

Olson e colaboradores (74) também verificaram ser a PCR clinicamente mais sensível que a imunofluorescência tanto na análise do escarro como na do lavado broncoalveolar.

A imunofluorescência com anticorpos monoclonais, por sua vez, conforme estudo de Elvin e colaboradores (31) mostrou-se mais sensível que a coloração pela prata na identificação de *Pneumocystis carinii* tanto no lavado broncoalveolar como no escarro.

Blumenfeld e colaboradores (12) compararam a PCR com colorações citomorfológicas convencionais no lavado broncoalveolar. Os resultados foram concordantes em 33 de 37 casos (89%). Nove amostras foram positivas e 24 negativas por ambas as técnicas. As discordâncias foram 3 casos positivos pela PCR e negativos pela citomorfologia e 1 caso negativo pela PCR e positivo pela citomorfologia.

Em nosso estudo, a concordância ocorreu em 74 de 78 casos (94,87%), sendo que os 4 casos discordantes foram de PCR positiva com as colorações citomorfológicas negativas.

Galan e colaboradores (34) compararam a PCR na detecção de *Pneumocystis carinii* no lavado broncoalveolar de 71 pacientes portadores de SIDA, com microscopia de iluminação convencional por algumas colorações usuais - Giemsa, azul de toluidina e prata - e com a microscopia por imunofluorescência. A amplificação do DNA foi positiva em 32 casos, sendo que, destes, 31 foram



positivos pela imunofluorescência e 30 pelas colorações convencionais. Por outro lado, houve 6 casos positivos pela imunofluorescência e negativos pela PCR. Na interpretação desses pesquisadores, a imunofluorescência detectaria a parede externa do *Pneumocystis carinii*, havendo ou não conteúdo celular, enquanto a PCR amplificaria o DNA, que é exclusivamente intracelular. Muitos dos resultados discrepantes ocorreram em pacientes que estavam sob quimioprofilaxia para *Pneumocystis carinii*, e os autores inferem a possibilidade de que, nesses casos, a amostra clínica poderia conter apenas restos de parede celular e, portanto, ser negativa quanto à amplificação do DNA, mas os trabalhos com microscopia eletrônica dos moldes alveolares sempre revelam alguns elementos fúngicos intactos. Outra inferência dos autores para explicar os resultados foi de que os casos positivos pela imunofluorescência e negativos pela PCR seriam devidos a espécimes mutantes de *Pneumocystis carinii*. Não há, no entanto, qualquer referência, no trabalho, a quadro clínico, radiologia ou evolução dos casos discrepantes para sabermos se poderia se tratar de falsos positivos de um método ou falsos negativos do outro.

Becker-Hapak e colaboradores (8) desenvolveram seus próprios oligonucleotídeos iniciadores e, em análise que teve como espécime clínico o escarro, o *Pneumocystis carinii* foi detectado em todas as amostras que haviam sido positivas por imunofluorescência e ainda identificado em algumas outras negativas pela imunofluorescência.

Lipschik e colaboradores (60) analisaram 71 amostras de escarro, das quais 17 provinham de pacientes com confirmação microbiológica de *Pneumocystis carinii* por métodos convencionais. A PCR foi positiva nos 17 casos e em mais 10 não confirmados pelos outros métodos. Nesse estudo, a amplificação do DNA foi realizada com dois conjuntos diferentes de oligonucleotídeos iniciadores oriundos de genes não relacionados, e os exames positivos somente pela PCR, em sua

maioria, foram positivos com os dois tipos de oligonucleotídeos, sugerindo que a técnica de amplificação de DNA é realmente mais sensível e que, em algumas situações, pode, inclusive, detectar a existência de uma infecção latente ou subclínica.

Pesquisadores da Universidade de Tóquio (53) também desenvolveram seus próprios oligonucleotídeos iniciadores com ótimos resultados e foram os primeiros a monitorizar o escarro de pacientes imunossuprimidos portadores de pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Verificaram que a PCR em amostra de escarro tornava-se negativa num período de 3 a 10 dias após o início do tratamento com pentamidina ou associação trimetoprim-sulfametoxazol.

Leigh e colaboradores (56) encontraram uma negatização da PCR para *Pneumocystis carinii* após nove dias de tratamento com trimetoprim-sulfametoxazol em um caso comprovado de pneumonia por esse fungo.

Os resultados desses dois trabalhos e a alta sensibilidade da PCR podem sugerir que a lesão pneumônica possa ser esterilizada com tratamento adequado mais cedo do que se supunha e que talvez a duração total da terapêutica possa ser reduzida.

A detecção de *Pneumocystis carinii* no soro de indivíduos com pneumonia por este fungo também tem sido objeto de estudo com a PCR.

Schluger e colaboradores (96) detectaram DNA de *Pneumocystis carinii* no soro de 7 de 18 pacientes imunodeficientes que apresentavam pneumonia por aquele agente etiológico, e no soro de 5 de 14 ratos infectados experimentalmente.

O mesmo grupo (95) publicou posteriormente outro estudo que detectava *Pneumocystis carinii* no soro de 12 de 14 pacientes com pneumonia por aquele microorganismo.

Lipschik e colaboradores (60) obtiveram uma amplificação do DNA de *Pneumocystis carinii* positiva no soro de 2 de 3 pacientes com pneumocistose disseminada e em somente 1 de 12 casos com evidência clínica de infecção restrita ao pulmão.

Estes achados reforçam as evidências da grande sensibilidade da PCR, bem como demonstram a possibilidade de disseminação hemática de *Pneumocystis carinii* a partir de um foco pulmonar, à semelhança do que ocorre com outras micoses profundas, permitindo um maior entendimento da patogenia desta infecção. Além disso, o achado de *Pneumocystis carinii* no soro poderia ser um indicativo de maior gravidade da moléstia.

Com a finalidade de tornar mais rápida a PCR, Borenshtein e colaboradores (14) utilizaram uma técnica de filtração do espécime clínico que substitui a extração convencional do DNA com fenol e obtiveram uma amplificação positiva em todas as 18 amostras que sabidamente continham *Pneumocystis carinii*. O espécime clínico utilizado foi o lavado broncoalveolar.

A revisão da literatura bem como os nossos resultados permitem dizer que a maior sensibilidade da PCR em comparação com as colorações convencionais e com a imunofluorescência é real e não artefactual.

A PCR apresenta outras propriedades além de alta sensibilidade e alta especificidade que a qualificam a tornar-se um método indispensável no diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas: requer pequenas quantidades de espécime clínico

(geralmente 0,5 ml de amostra é suficiente); o espécime clínico que será submetido a análise pode ser colhido pelo menos 1 a 2 dias após o início da terapêutica sem alteração do resultado; é de rápida execução (24 a 48 horas são suficientes para fornecer-se o resultado); o DNA da amostra a ser amplificado pode ser conservado por longos períodos.

Resta ainda esclarecer alguns poucos casos na literatura em que a PCR é capaz de identificar o *Pneumocystis carinii* em espécime clínico de paciente imunossuprimido sem que haja evidência clínica ou radiológica de infecção por este fungo. Possivelmente trata-se de casos de colonizações ou de pacientes com infecção subclínica.

A comprovação de tal hipótese está a exigir maiores investigações, não havendo ainda uma conduta estabelecida frente a tais resultados. Deveríamos tratar esses pacientes, fazer profilaxia, ou simplesmente observá-los? Tais questões, porém, não foram objeto desta tese e com certeza serão respondidas com novos estudos.

Provavelmente a estratégia mais adequada para se chegar ao diagnóstico definitivo de pneumonia por *Pneumocystis carinii* em pacientes imunodeficientes seja o uso seqüencial da PCR no escarro induzido, seguido do lavado broncoalveolar nos pacientes cujo escarro foi negativo ou impossível de colher. Isso, pelo menos, até que um método de cultivo rápido e simples para este fungo venha a se tornar disponível.

A introdução da PCR em nosso meio como método de identificação do *Pneumocystis carinii* facilitará e antecipará a utilização da técnica para diagnóstico etiológico de outras doenças infecciosas que são de difícil identificação

microbiológica como, por exemplo, meningite tuberculosa, tuberculose pleural, pneumonia por legionela e por citomegalovírus, entre outras.

Existe ainda a possibilidade de este método vir a identificar microorganismos resistentes quando a resistência estiver relacionada a alterações na própria estrutura do DNA. Isto já é uma realidade, por exemplo, na identificação de estirpes de estafilococos resistentes à meticilina (97, 104).

Além disso, visualiza-se a perspectiva de utilização de múltiplos pares de *primers* para amplificação de DNA de diferentes agentes etiológicos em uma mesma reação, bem como a possibilidade de redução do custo da reação quando o método estiver amplamente difundido.

## 8 - CONCLUSÕES

---

## 8 - CONCLUSÕES

1º - A reação em cadeia pela polimerase permitiu amplificar e detectar DNA de *Pneumocystis carinii* no lavado broncoalveolar de pacientes portadores de pneumonia por esse microorganismo.

2º - A concordância da reação em cadeia pela polimerase com os métodos rotineiros de Leishmann, Papanicolaou e prata de Grocott em conjunto, na identificação de *Pneumocystis carinii*, foi de 94,9%.

3º - Os métodos rotineiros em conjunto apresentaram uma sensibilidade de 76,5% e especificidade de 100%, considerando-se a reação em cadeia pela polimerase como padrão-áureo.

4º - A prevalência de pneumonia por *Pneumocystis carinii* determinada por meio da reação em cadeia pela polimerase, em pacientes sintomáticos respiratórios portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida foi de 21,8%.

## **9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



---

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Abbot CM, Mc Mahon CJ, Whitehouse DB, Povey S. Prenatal diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency using polymerase chain reaction. **Lancet** 1988;1:763-4.
- 2 - Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. **J Clin Microbiol** 1990; 28:2659-67.
- 3 - Ambroise-Thomas P, Cristina N. Results and contributing prospects of molecular probes and genetic amplification in vitro (PCR) in toxoplasmosis. (Fre) **Bull Acad Natl Med** 1991;175:39-47.
- 4 - Ammich O. Über die nicht syphilitische interstieile pneumonie des ersten kindersalters. **Virchows Archiv Pathological Anatomy** 1938;302:539-54.
- 5 - Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. **Lancet** 1991;337:189-92.
- 6 - Bagnarelli P, Menzo S, Manzin A, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. **J Virol Methods** 1991;32:31-9.
- 7 - Ballabio A, Gibbs R, Caskey CT. PCR test for cystic fibrosis detection. **Nature** 1990;343:20.

- 8 - Becker-Hapak M, Liberator P, Graves D. Detection of human *Pneumocystis carinii* by the polimerase chain reaction. **J Protozool** 1991;38(6):191S-4S.
- 9 - Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Detection of viable *Legionella pneumonia* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. **Applied Envir Microbiol** 1991;57:597-600.
- 10 -Bessen MT, Luo QA, Rotbart HA, Laser MJ, Ellison RT. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. **Applied & Environm** 1990;56:2930-2.
- 11 -Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, et al. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Am Rev Resp Dis** 1986;133:515-8.
- 12 -Blumenfeld W, Mc Cook O, Holodnly M, Katzenstein DA. Correlation of morphologic diagnosis of *Pneumocystis carinii* with the presence of pneumocystis DNA amplified by polimerase chain reaction. **Mod Pathol** 1992;5(2):103-6.
- 13 -Boletim Epidemiológico SSMARGS, mar. 1993;1(4).
- 14 -Borenshtein L, Hatin I, Simonpoli AM, Ugarte E, Girard PM, Jauregviberry G. An alternative to DNA extraction for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by polimerase chain reaction using a new oligonucleotide probe. **Mol Cell Probes** 1992;6(5):361-5.
- 15 -Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. **Lancet** 1991;338:364:6.

- 16 -Broaddus C, Dake MD, Sjulbare MS, et al. Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann Intern Med** 1985;102:747-52.
- 17 -Brytting M, Sundqvist VA, Stalhandiske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. **J Virol Methods** 1991;32:127-38.
- 18 -Burke BA, Krovetz LY, Good KA. Occurrence of *Pneumocystis carinii* pneumonia in children with agammaglobulinemia. **Pediatrics** 1961;28:196.
- 19 -Burstain JM, Grimprel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponaema pallidum* by using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1991;29:62-9.
- 20 -Carini A. Formas de eschizogonia do trypanozoma lewisi. **Comunicazones des Sociedade de Medicina**. São Paulo, 1910:204.
- 21 -Centers for Disease Control. Update: acquired immunodeficiency syndrome - United States. **MMWR** 1986;35:17-21.
- 22 -Chagas C. Nova Trypanozomiaza humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n gen, n sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1:159.
- 23 -Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Cadkey CT. Delection screening of the Duchenne muscular dystrophie locus via multiplex DNA amplification. **Nucl Acids Res** 1988;16:1141-7.

- 24 -Cristal RG, Reynolds HY, Kalica AR. Bronchoalveolar lavage: the report of an international conference. **Chest** 1986;90:122-31.
- 25 -Cristiano K, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Feinstone SM. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. **Hepatology** 1991; 14:51-5.
- 26 -Delanoe P, Mme Delanoe. De la rareté de pneumocystis carinii chez les cobayes de la région de Paris, absence de kystes chez D'Autres animaux: lapin, grenouille, 3 anguilles. **Bull Soc Pathol Exot Filiales** 1914;7:271.
- 27 -Denton PH, Fowlkes DM, Lord ST, Reisner HM. Hemophilia B Durhan: a mutation in the first EGF-like domain of factor IX that is characterized by polymerase chain reaction. **Blood** 1988;72:1407-11.
- 28 -Edman JC, Kovaes JA, Masur H, Santi D, Elwood H, Sogin M. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. **Nature** 1988;334:5129-32.
- 29 -Eggerding FA, Peters J, Lee RK, Inderlied CB. Detection of rubella virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA. **J Clin Microbiol** 1991;29:945-52.
- 30 -Eiden JJ, Wilde J, Firoozmand F, Yolken R. Detection of animal and human group B rotaviruses in faecal specimens by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1991;29:539-43.

- 31 -Elvin KM, Björkamn A, Linder E, Heurlin N, Hjerpe A. *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage by monoclonal antibodies. **BMJ** 1988;297:381-4.
- 32 -Embury SH, Scharf SJ, Saiki RK, et al. Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. **N Engl J Med** 1987; 316:656-61.
- 33 -Erlich HA, Gelfand DH, Saiki RK. Specific DNA amplification. **Nature** 1988;331:461-2.
- 34 -Galan F, Oliver JL, Roux P, Poirot JL, Bereziat G. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by polimerase chain reaction compared to direct microscopy and immunofluorescence. **J Protol** 1991;38(6):1995-200s.
- 35 -Gentry LO, Remington JS. *Pneumocystis carinii* pneumonia in siblings. **J Pediatr** 1970;76:769-72.
- 36 -Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N Engl J Med** 1981;305:1425-31.
- 37 -Gouvea V, Allen JR, Glass RI, et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1991;29:519-23.
- 38 -Greenfield C, Sinickas V, Harrison LC. Detection of cytomegalovirus by the polymerase chain reaction: a simple, rapid and sensitive non-radioactive method. **Med J Australia** 1991;154:383-5.

- 39 -Griffths MH, Kocjan G, Miller RF, Godfrey-Fousett P. Diagnosis of pulmonary disease in human immunodeficiency virus infection: role of transbronchial biopsy and bronchoalveolar lavage. **Thorax** 1989;44:554-8.
- 40 -Haque A, Plattner SB, Cook R, Halt M. *Pneumocystis carinii*: taxonomy as viewed by electron microscopy. **Am J Clin Pathol** 1987;87:504-10.
- 41 -Hendry WS, Patrick RL. Observations of thirteen cases of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Am J Clin Pathol** 1962;38:401-5.
- 42 -Hermans PW, Schuitema AR, Van Soolingen D, et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1990;28:1204-13.
- 43 -Higuchi D, Von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. **Nucl Acids Res** 1988;332:543-6.
- 44 -Hopkin J. *Pneumocystis carinii*. In: \_\_\_\_\_. The occurrence of *pneumocystis* pneumonia and infection. Oxford:Oxford University, 1991:1-27.
- 45 -Jackson JB. Polymerase chain reaction assay for detection of hepatitis B virus. **Amer J Clin Pathol** 1991;95:442-4.
- 46 -Jangeguiberry G, Hatin I, d'Auriol L, Galibert G. PCR detection of *Plasmodium falciparum* by oligonucleotide probes. **Mole Cell Probes** 1990;4:409-14.
- 47 -Jasen RW, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis: a virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction. **Proc Natl Acad Sci** 1990;87:2867-72.

- 48 -Jeffreys AL, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human mini satellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. **Nucl Acids Res** 1988;16:10593-971.
- 49 -Johnson JD, Holliman RE, Savva D. Detection of *Toxoplasma gondii* using the polymerase chain reaction. **Biochem Soc Transact** 1990;18:665.
- 50 -Jules-Elysee KM, Stoven DE, Zamam MB, et al. Aerosolized pentamidine effect on diagnosis and presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Ann Intern Med** 1990;192:750-7.
- 51 -Kaneko S, Kobayashi K, Miller RH. Detection of hepatitis B virus using the polymerase chain reaction technique. **J Clin Lab Anal** 1990;4:479-82.
- 52 -Kimura H, Shibata M, Kuzushima K, Nishikawa K, Nishiyama Y, Morishima T. Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction. **Med Microbiol Immunol** 1990;179:177-84.
- 53 -Kitada K, Oka S, Kimura, Skimada K, Nakamura Y. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* by 5s ribosomal DNA amplification. **J Protozool** 1991;38(6):90S-1S.
- 54 -Knechet H, Odermatt BF, Bachmann E, et al. Frequent detection of Epstein-Barr virus DNA by the polymerase chain reaction in lymph node biopsies from patients with Hodgkin's disease without genomic evidence of B- or T-cell clonality. **Blood** 1991;78:760-7.

- 55 -Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic disease by analysis of amplified DNA sequences: application to haemophilia. **N Engl J Med** 1987;317:985-90.
- 56 -Leigh TR, Gazzard BG, Rowbottom A, Collins JV. Quantitative and qualitative comparison of DNA amplification by PCR with immunofluorescence staining for pneumonia. **J Clin Pathol** 1993;46(2):140-4.
- 57 -Leigh TR, Wakefield AE, Peters SE, Hopkin JM, Collins JV. Comparison of DNA amplification and immunofluorescence for detecting *Pneumocystis carinii* in patients receiving immunosuppressive therapy. **Transplantation** 1992;54(3):468-70.
- 58 -Li H, Cui X, Arnheim N. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. **Proc Natl Acad Sci** 1990;87:4580-4.
- 59 -Li H, Gyllensten UB, Cui XF, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. **Nature** 1988;335:414-7.
- 60 -Lipschik GY, Gill VJ, Lundgren JD, et al. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. **Lancet** 1992;340(8813):203-6.
- 61 -Manzin A, Salvoni G, Bangnarelli P, Menzo S, Carolni G, Clementi M. A single-step DNA extraction procedure for the detection of serum hepatitis B sequences by the polymerase chain reaction. **J Virol Methods** 1991;32:245-53.



- 62 -Masur H, Michelis MA, Green JB, et al. An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. **N Engl J Med** 1981;305:1431-8.
- 63 -Masur H. Prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **N Engl J Med** 1992;327(26):1853-60.
- 64 -McIntosh I, Curtis A, Millan FA, Brock DJ. Prenatal exclusion testing for Huntington disease using the polymerase chain reaction. **Am J Med Genet** 1989;32:274-6.
- 65 -Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD, Beckers PJ, Sleben M. *Pneumocystis* in humans. **J Infec Dis** 1977;136:43-9.
- 66 -Millard P, Heryet A. Observations favouring *Pneumocystis carinii* as a primary infection: a monoclonal antibody study on paraffin sections. **J Pathol** 1988;154:365-70.
- 67 -Miller RF, Millar AB, Weller IVD, Semple SJG. Empirical treatment without bronchoscopy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. **Thorax** 1989;44:559-64.
- 68 -Milligan SA, Stulbarg MS, Gamsu G, Golden JA. *Pneumocystis carinii* radiographically simulating tuberculosis. **Am Rev Resp Dis** 1985;132:1124-6.
- 69 -Mirelamn D, Bracha R, Rozenblatt S, Grafinkel LI. Repetitive DNA elements characteristic of pathogenic *Entamoeba histolytica* strains can also be detected after polymerase chain reaction in a cloned non-pathogenic strain. **Inf Immun** 1991;58:1660-3.

- 70 -Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol** 1987;155:335-50.
- 71 -Murray JF, Felton CP, Garay SM, et al. Pulmonary complication of the acquired immunodeficiency syndrome: report of a national heart, lung, and blood institute workshop. **N Engl J Med** 1984;310:1682-8.
- 72 -Niaher H, Drzonek H, Wolf J, von Knebel Doeberitz M, Petzoldt D. Detection of *C. trachomatis* in urogenital specimens by polymerase chain reaction. **Genitourin** 1991;67:211-4.
- 73 -Nicoll JA, Maitland NJ, Love S. Use of polymerase chain reaction to detect herpes simplex virus DNA in paraffin sections of human brain at necropsy. **J Neurol Neurosurgery Psych** 1991;54:167-8.
- 74 -Olson M, Elvin K, Lofdahl S, Linder E. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1993;31(2):221-6.
- 75 -Ostergaard L, Birklund S, Christiansen G. Use the polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia trachomatis*. **J Clin Microbiol** 1990;28:1254-60.
- 76 -Ou C-Y, Kwok S, Mitchell SV, et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. **Science** 1988;239:295-7.

- 77 -Patil RV, Dekker EE. PCR amplification of an *Escherichia coli* gene using mixed primers containing deoxynosine at ambiguous positions in degenerate amino acids condons. **Nucl Acis Res** 1991;119:18-3080.
- 78 -Peters JE, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. Quantification of the detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. **Mol Cell Probes** 1992;6(2):115-7.
- 79 -Peters SF, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. **J Pathol** 1992;166:195-8.
- 80 -Peters SG, Prakash BS. *Pneumocystis carinii* pneumonia: review of 53 cases. **Am J Med** 1985;82:73-8.
- 81 -Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, Woods D. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. **Pediatrics** 1978;61:35-41.
- 82 -Piiparainen H, Vaheri A. Genotyping of herpes simplex viruses by polymerase chain reaction. **Archives of Virol** 1991;119:275-83.
- 83 -Pitchenik AE, Ganjei P, Torres, et al. Sputum examination for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. **Am Rev Resp Dis** 1986;133:226-9.
- 84 -Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. **Mol Microbiol** 1991;5(6):1347-51.

- 85 -Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick T. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested primer gene amplification assay. **J Clin Microbiol** 1990;28:1913-7.
- 86 -Pollard DR, Tyler SD, Ng CW, Rozee KR. A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the specific detection of *Chlamydia sp.* **Mol Cell Probes** 1989;3:383-9.
- 87 -Reddy LV, Zammit C, Sehman P, Crane LR. Detection of *Pneumocystis carinii* in a rat model of infection by polymerase chain reaction. **Mol Cell Probes** 1992;6(2):137-43.
- 88 -Rikfind D, Starzl TE, Marchioro TL, et al. Transplantation pneumonia. **JAMA** 1964;189:808-12.
- 89 -Roewer L, Riess O, Prokop O. Hybridization and polymerase chain reaction amplification of simple repeated DNA sequences for the analysis of forensic stains. **Electroph** 1991;12:181-6.
- 90 -Saiki RK, Bugawan H, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature** 1986;324:163-6.
- 91 -Saiki RK, Chang C-A, Levenson CH, et al. Diagnosis of sickle cell anemia and B-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. **N Engl J Med** 1988;319:537-41.
- 92 -Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 1988;319:487-91.

- 93 -Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 1985;230:1350-4.
- 94 -Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. **Sciences** 1986;233:1076-8.
- 95 -Schluger N, Godwin T, Sepkowitz K, et al. Application of DNA amplification to *Pneumocystis*: presence of serum *Pneumocystis carinii* DNA during human and experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. **J Exp Med** 1992;176(5):1327-33.
- 96 -Schluger N, Sepkowitz K, Armstrong D, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* in serum of AIDS patients with *pneumocystis* pneumonia by the polimerase chain reaction. **J Protozool** 1991;38(6):240S-2S.
- 97 -Serhat K. Detection of methicilin-resistant *Staphylococci* by using the polimerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1992;30:1685-91.
- 98 -Sjobring U, Mecklenburg N, Anderson AB, Miorner H. Polymerase chain reaction of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol** 1990;28:2200-4.
- 99 -Stanley M. Genital papillomavirus, polymerase chain reaction and cervical cancer. **Genitourin Med** 1990;66:415-7.
- 100 -Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. **J Clin Microbiol** 1989;27:1257-61.

- 101 -Suffredini AF, Ognibene FP, Lackee, et al. Nonspecific interstitial pneumonitis: a common cause of pulmonary disease in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann Intern Med** 1987;107:7-13.
- 102 -Telenti A, Marshall WF, Smith TF. Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1990;28:2187-90.
- 103 -Tregnago R. Identificação de *Pneumocystis carinii* no lavado broncoalveolar em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida. [Tese de mestrado]. Porto Alegre:UFRGS, 1990.
- 104 -Ubukata K. Rapid detection of mec A gene in methicillin: resistant *Staphylococci* by enzymatic detection of polimerase chain reaction products. **J Clin Microbiol** 1992;30:1728-33.
- 105 -Van de Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Balboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1990;28:2739-43.
- 106 -Van der Meer G, Brug SL. *Pneumocystis* als parasiet bij den mensch. **Ned Tijdschr Geneesk** 1942;86:2066.
- 107 -Vanek J. Atypical interstitial pneumonia of infants produced by *Pneumocystis carinii*. **Cas Lek Cesk** 1951;90:1121.
- 108 -Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Lancet** 1991;337:1378-9.

- 109 -Wakefield AE, Hopkin JM, Burns J, Hipkiss JR, Stewart TJ, Moxon ER. Cloning of DNA from *Pneumocystis carinii*. **J Inf Dis** 1988;158(4):859-62.
- 110 -Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, et al. *Pneumocystis carinii* shows DNA homolgy with the ustomycetous red yeast fungi. **Mol Microbiol** 1992;6(14):1903-11.
- 111 -Wakefield AE, Pislej FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. **Lancet** 1990;336:451-3.
- 112 -Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. **Ann Intern Med** 1974;80:83-93.
- 113 -Weiss LM, Mohaved LA, Billingham ME, Cleary ML. Detection of coxsackie virus B3 RNA in myocardial tissues by the polymerase chain reaction. **Amer J Pathol** 1991;138:497-503.
- 114 -Williamson AL, Denis SJ. The use of polymerase chain reaction for the detection of human papilloma virus type 13. **J Virol Meth** 1991;31:57-65.
- 115 -Williams D, Yougleith M, Adams G, Glassort J. The role of fiberoptic bronchoscopy in the evaluation of immuno compromised host with diffuse pulmonary infiltrates. **Am Rev Resp Dis** 1985;131:880-5.
- 116 -Winship PR, Rees DJ, Alkan M. Detection of polymorphisms at cytosine phosphoguanidine dinucleotides and diagnosis of haemophilia B carriers. **Lancet** 1989;1:631-4.

117 -Yang C-F, De L, Holloway BP, Pllansch MA, Kew OM. Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. **Virus Res** 1991;20:159-79.

118 -Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. **Infect Immun** 1992;60:4140-5.



**RESUMO**

---

## RESUMO

Amostras do lavado broncoalveolar de 78 pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com síndrome de imunodeficiência adquirida, sintomas respiratórios e submetidos a broncofibroscopia diagnóstica foram analisadas quanto à presença de *Pneumocystis carinii*, utilizando-se a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e os métodos de coloração rotineiros de Leishman, Papanicolaou e prata de Grocott. A PCR foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores pAZ 102-E: -5'- GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA - 3' - e pAZ 102-H: 5' - GTC TAC GTT GCA AAG TAC TC - 3' -. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose, e banda específica de *Pneumocystis carinii* (346 pares de bases) corada com brometo de etídio foi identificada com luz ultravioleta e fotografada.

A PCR amplificou o DNA de *Pneumocystis carinii* em 17 amostras, enquanto os métodos rotineiros mostraram resultados positivos em 13 dessas mesmas amostras e resultados negativos nas 65 restantes.

A concordância dos resultados entre a PCR e os métodos rotineiros foi de 94,9% (74/78 casos).

A sensibilidade dos métodos rotineiros, considerando-se a PCR como padrão-áureo, foi de 76,5% (13/17 casos).

A prevalência de infecção pulmonar por *Pneumocystis carinii* avaliada pela PCR, nesta população, foi de 21,8% (17/78 casos).

Nossos resultados bem como os dados da literatura sugerem que a maior sensibilidade da PCR, em comparação com as colorações convencionais, é real e que este novo método deve ser considerado como padrão-áureo para o diagnóstico da infecção pulmonar por *Pneumocystis carinii*.

## **SUMMARY**

---

## SUMMARY

Bronchoalveolar lavage samples from 78 patients admitted to the Hospital de Clínicas de Porto Alegre with acquired immunodeficiency syndrome, respiratory symptoms and submitted to diagnostic bronchoscopy were analysed in order to detect *Pneumocystis carinii* by polymerase chain reaction (PCR) and routine Leishman, Papanicolaou and Grocott's silver stains.

PCR was performed with the oligonucleotide primers pAZ 102-E: -5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA - 3' - e pAZ 102-H: 5' - GTC TAC GTT GCA AAG TAC TC - 3' -. The amplification products were subjected to electrophoresis in agarose gels, and the *Pneumocystis carinii* specific band (346 base pairs) was tested by visualisation with ultraviolet light after ethidium bromide staining and photographed.

*Pneumocystis carinii* DNA was amplified by PCR in 17 samples. Using the routine methods the microorganism was found in 13 samples from PCR-positive patients and not identified in all the remaining 65.

The concordance between PCR and the routine methods were 94.9% (74/78 samples).

The sensitivity of the routine methods considering PCR as the gold standard was 76.5% (13/17 samples).

The prevalence of *Pneumocystis carinii* lung infections analysed by PCR, in this population, was 21.8% (17/78 samples).

Our results and the review of the literature suggest that the PCR's larger sensitivity, comparing with the conventional stains, is real and that this new method should be considered the gold standard to the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia.