



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*

Gustavo Wissmann^{a,b,*}, Ruben Morilla^b, Vicente Friaça^b, Enrique Calderón^b y Jose M. Varela^b

^a Grupo de Estudios en *Pneumocystis*, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 5 de junio de 2008

Aceptado el 25 de julio de 2008

On-line el 29 de abril de 2009

Palabras clave:

Pneumocystis jirovecii

Neumonía

Colonización

Inmunodepresión

RESUMEN

Pneumocystis jirovecii es un hongo y se lo reconoce como una especie que infecta exclusivamente a seres humanos; es el agente causante de la PCP (*Pneumocystis pneumonia* 'neumonía por *Pneumocystis*'). La utilización de técnicas de biología molecular como herramienta diagnóstica ha permitido detectar la presencia de este hongo en individuos que se encuentran solamente colonizados por el microorganismo. Esta colonización, observada en diversos grupos de población, puede actuar como un reservorio del hongo para el ser humano. Varios estudios también han demostrado la presencia de *P. jirovecii* con mutaciones asociadas a resistencia a sulfamidas en pacientes colonizados; éstos podrían transmitir este genotipo mutante a individuos susceptibles al desarrollo de una PCP. El creciente interés respecto a la colonización por *P. jirovecii* conducirá a diseñar nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de la neumonía causada por este patógeno.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Human reservoirs of *Pneumocystis*

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii, the fungal agent that causes *Pneumocystis pneumonia* (PCP), is known to exclusively infect humans. Molecular studies have enabled detection of this fungus in individuals who have been colonized by *P. jirovecii*. Such colonization, found in several populations, seems to act as a human reservoir for the fungus. Various studies have reported mutations associated with sulfa resistance in *P. jirovecii* strains isolated from colonized patients, who can transmit the mutant genotype to PCP-susceptible individuals. The growing interest in *P. jirovecii* colonization may prompt the design of new prevention and management strategies for PCP.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La PCP (*Pneumocystis pneumonia* 'neumonía por *Pneumocystis*') se mantiene todavía como un importante problema de salud pública con una alta morbilidad entre los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo en los infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en los que aún es la primera causa definitoria de sida¹.

El conocimiento sobre la biología de los organismos conocidos como *Pneumocystis* ha estado plagado de confusiones, desacuerdos y controversias motivados, en gran parte, por la imposibilidad para lograr su cultivo in vitro. Esto hizo que durante mucho tiempo se lo considerase como un protozoo pero recientemente, con la utilización de técnicas de biología molecular, se ha podido establecer que es un hongo atípico, que no crece en los medios de

cultivo habituales ni responde a los tratamientos clásicos frente a hongos².

La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Pneumocystis*³ en los estudios epidemiológicos ha incorporado avances significativos en la comprensión de los mecanismos de transmisión de este patógeno.

Inicialmente se pensaba que había una sola especie de *Pneumocystis* que infectaba a todos los mamíferos y, por tanto, se creía que la PCP en la especie humana podía ser una zoonosis y que cualquiera de los mamíferos con los que puede cohabitar el hombre de forma habitual podía ser su reservorio. Sin embargo, el estudio comparativo del ADN de aislados de *Pneumocystis* procedentes de diferentes mamíferos ha demostrado que se trata de especies distintas (tabla 1)^{4–20}. Esta alta especificidad entre el huésped y el microorganismo que lo infecta es lo que se denomina estenoxenismo. Este hecho ha motivado un cambio de denominación de la especie de *Pneumocystis* que infecta a los seres humanos, que ha pasado a denominarse *Pneumocystis jirovecii*²¹, y

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gwissmann@uol.com.br (G. Wissmann).

Tabla 1
Diferencias genéticas de *Pneumocystis* entre diversos mamíferos (modificado de Aliouat-Denis CM, Infection, Genetics and Evolution, 2008)

	<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Pneumocystis wakefieldiae</i>	<i>Pneumocystis murina</i>	<i>Pneumocystis oryctolagi</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>Pneumocystis de primates no humanos</i>	<i>Pneumocystis de hurón</i>	<i>Pneumocystis de caballos</i>	<i>Pneumocystis de cerdos</i>	<i>Pneumocystis de perros</i>
Huésped	Rata (<i>rattus norvegicus</i>)	Rata (<i>rattus norvegicus</i>)	Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Hombre (<i>Homo sapiens</i>)	Macacos de diversas especies	Hurón (<i>Mustela putorius furo</i>)	Caballo (<i>Equus caballus</i>)	Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	Perro (<i>Canis familiaris</i>)
Gen										
<i>mtLSUrRNA</i>	Cushion, 1998 ⁴	Cushion, 1998 ⁴	Ruan et al. inédito	Wakefield et al, 1992 ⁵	Wakefield et al, 1992 ⁵	Demanche et al, 2001 ⁶	Wakefield et al, 1992 ⁵	Peters et al, 1994b ⁷	Keely et al, 1994 ⁸	English et al, 2001 ⁹
<i>mtSSUrRNA</i>	Hunter and Wakefield, 1996 ¹⁰	Hunter and Wakefield, 1996 ¹⁰	Hunter and Wakefield, 1996 ¹⁰	Hunter and Wakefield, 1996 ¹⁰	Hunter and Wakefield, 1996 ¹⁰	Demanche et al, 2001 ⁶	Hunter and Wakefield, 1996 ¹⁰			
ITS del ARN ribosomal nuclear	Ortiz-Rivera et al, 1995 ¹¹	Ortiz-Rivera et al, 1995 ¹¹	Keely et al, 2004 ¹²	Li et al, inédito	Ortiz-Rivera et al, 1995 ¹¹ ; Lu et al, 1994 ¹³	Hsueh et al, 2001 ¹⁴				
<i>Arom</i>	Banerji et al, 1993 ¹⁵	Banerji et al, 1995 ¹⁶	Banerji et al, 1995 ¹⁶	Banerji et al, 1995 ¹⁶	Banerji et al, 1995 ¹⁶		Banerji et al, 1995 ¹⁶			
DHFR	Ma et al, 2001 ¹⁷	Ma et al, 2001 ¹⁷	Ma et al, 2001 ¹⁷	Ma et al, 2001 ¹⁷	Ma et al, 1999 ¹⁸	Ma et al, 2001 ¹⁷	Ma et al, 2001 ¹⁷			Ma et al, 2001 ¹⁷
DHPS	Stedman et al, 1998 ¹⁹	Lane et al, 1997 ²⁰	Lane et al, 1997 ²⁰	Ma et al, 2001 ¹⁷	Ma et al, 1999 ¹⁸	Demanche et al, 2001 ⁶	Ma et al, 2001 ¹⁷			Ma et al, 2001 ¹⁷

ARN: ácido ribonucleico; *Arom*: gen asociado a biosíntesis de aminoácidos aromáticos; DHFR: dihidrofolato reductasa; DHPS: dihidropteroato sintasa; ITS: *internal transcribed spacer* 'espaciador transcrito interno'; *mtLSUrRNA*: subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial; *mtSSUrRNA*: subunidad menor del ARN ribosómico mitocondrial.

Tabla 2

Genotipos de *Pneumocystis jirovecii* (modificado de Aliouat-Denis CM, Infection, Genetics and Evolution, 2008)

Gen	Número de genotipos	Referencias
<i>mtLSUrRNA</i>	6	Keely et al, 1995 ²² ; Latouche et al, 1994 ²³ , 1996 ²⁴ , 1997 ²⁵ ; Tsolaki et al, 1998 ²⁶ ; Wakefield et al, 1994 ²⁷
<i>mtSSUrRNA</i>	2	Hunter and Wakefield, 1996 ¹⁰ ; Tsolaki et al, 1998 ²⁶
ITS 1 y 2 del ARN ribosómico	Más de 30 genotipos de ITS1; 40 genotipos de ITS2	Lee et al, 1998 ²⁸ ; Tsolaki et al, 1996 ²⁹ ; Beser et al, 2007 ³⁰

ARN: ácido ribonucleico; ITS: *internal transcribed spacer* 'espaciador transcrito interno'; *mtLSUrRNA*: subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial; *mtSSUrRNA*: subunidad menor del ARN ribosómico mitocondrial.

la denominación de *Pneumocystis carinii* ha quedado reservada para la especie causante de las infecciones en ratas. Por tanto, la PCP no es una zoonosis, como se creía, sino una antroponosis (reservorio exclusivamente humano).

El análisis molecular de *P. jirovecii* ha permitido también identificar variaciones en su propio genoma. En la [tabla 2](#) se muestran los genes de *P. jirovecii* que se han empleado para la investigación en estudios epidemiológicos^{22–30}.

Durante años se consideró que la PCP se producía por reactivación de una infección latente ante una situación de inmunosupresión en el huésped. Esta hipótesis se apoyaba en la alta seroprevalencia encontrada en estudios epidemiológicos realizados en niños. No obstante, otros trabajos que utilizaron técnicas moleculares permitieron evidenciar que las recurrencias de PCP en pacientes con sida se producían por subtipos diferentes de *P. jirovecii*, como lo demostraba el hecho de que sus genotipos no fueran iguales, al analizar tanto el gen mitocondrial como las regiones ITS (*internal transcribed spacer* 'espaciador transcrito interno') del ácido ribonucleico ribosómico nuclear; esto apoya la existencia de infecciones de novo³¹. En esta misma línea, la hipótesis de una latencia prolongada también se cuestionó luego de que se observara en modelos animales que el microorganismo desaparecía de los pulmones tras la curación de una neumonía³². Por otra parte, se ha descrito la existencia de variaciones geográficas en los genotipos de *P. jirovecii* en el hombre. Así, en un estudio realizado en 5 ciudades de EE. UU. se encontró relación entre el genotipo de *Pneumocystis* y el lugar de residencia, pero no con el lugar de nacimiento de los sujetos con PCP, lo que apoya la idea de una transmisión persona a persona en contra de la hipótesis de la reactivación de una infección latente³³.

A partir de la consideración de la neumocistosis humana como una infección adquirida de novo surge la pregunta de cuál es el reservorio de este microorganismo. Algunos estudios han demostrado la presencia de fragmentos de ADN de *Pneumocystis* en muestras de agua de diferentes procedencias así como en el aire, pero no se ha podido comprobar que estos medios sean reservorios o fuentes de infección para este patógeno^{34,35}. Los pacientes con PCP pueden actuar como fuentes de infección, así como los niños en los que los estudios seroepidemiológicos han mostrado altas tasas de exposición desde edades muy tempranas. Se evidencia, además, la presencia de genotipos similares en ambas poblaciones^{36–38}. Sin embargo, en los últimos años muchas pruebas han revelado que *P. jirovecii* está presente de forma más extendida entre los seres humanos.

La colonización en el hombre

La identificación de *Pneumocystis* con un método sensible como es la PCR ha permitido demostrar la presencia de este microorganismo en diferentes muestras biológicas tales como lavado broncoalveolar, esputo, lavado orofaríngeo o material nasofaríngeo en sujetos sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía. Esta situación ha sido denominada con diferentes términos, como colonización, estado de portador asintomático (*carrier*) o infección subclínica^{39,40} y se ha observado en distintos grupos poblacionales que se comentan a continuación:

- a) La colonización por *P. jirovecii* es frecuente en pacientes con infección por VIH. Un estudio reciente realizado en una cohorte de 172 sujetos infectados por el virus encontró una prevalencia de colonización del 68% y se identificaron como factores de riesgo las concentraciones de linfocitos CD4 inferiores a $50 \times 10^6/l$ y la ausencia de quimioprofilaxis con cotrimoxazol⁴¹. En otro estudio que incluyó a 91 pacientes con infección por VIH, el tabaquismo y la ciudad de residencia fueron los factores asociados a la colonización por *Pneumocystis* que apareció en el 46% de los casos⁴². El período durante el que los pacientes con infección por VIH pueden permanecer colonizados se desconoce en la actualidad, pero se sospecha que puede ser prolongado⁴³. Este hecho, junto con la alta prevalencia de colonización, convierte a estos pacientes en un grupo importante como posible reservorio y fuente de transmisión para otros sujetos susceptibles.
- b) El segundo grupo de interés corresponde a pacientes con enfermedades pulmonares crónicas. Algunos de éstos, al ser expectoradores crónicos habituales, podrían ser un eslabón importante en la transmisión de *P. jirovecii* a otros individuos. De hecho, se han identificado genotipos similares del hongo entre pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y pacientes con PCP⁴⁴. Entre los pacientes con enfermedad pulmonar crónica se ha descrito una prevalencia de colonización del 40,5% en los casos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)⁴⁵ y del 21,5% en los casos de fibrosis quística⁴⁶. En pacientes con enfermedad intersticial pulmonar, la colonización observada es del 33,8%, con variaciones entre las distintas entidades: el 37,8% en la neumopatía intersticial idiopática; el 19,8% en la sarcoidosis, y el 37% en otras enfermedades intersticiales pulmonares⁴⁷. Se considera que el uso de corticoides puede ser un factor de riesgo independiente para la colonización en estos sujetos⁴⁸. Está bien establecido que la PCP desencadena una intensa respuesta inflamatoria, de tal forma que la gravedad del cuadro clínico es independiente de la cantidad de hongo en los pulmones⁴⁹. En esta misma línea, se ha observado en modelos animales que la colonización produce también una respuesta inflamatoria que sucede desde etapas muy iniciales de la infección. En monos portadores del virus de la inmunodeficiencia del simio, la colonización por *Pneumocystis* provoca inflamación de las vías aéreas, con aumento de citocinas proinflamatorias y neutrófilos en el lavado broncoalveolar, así como deterioro de la función pulmonar^{50,51}. En pacientes con EPOC se ha descrito una prevalencia de colonización más elevada entre aquéllos con estadios más avanzados de la enfermedad. Así, la prevalencia de colonización fue del 36,7%, en pacientes en estadio IV de la clasificación GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) frente al 10% en los estadios II o III de la clasificación GOLD. Estos datos demuestran un papel de la colonización por *P. jirovecii* como cofactor en la progresión de la EPOC⁵².

- c) El personal sanitario constituye otro grupo de población que ha sido motivo de estudio para la colonización por *Pneumocystis*. El primer trabajo sobre el tema no logró detectar la presencia de *P. jirovecii* en el lavado orofaríngeo de una pequeña muestra de profesionales en contacto con pacientes con PCP⁵³. Sin embargo, estudios posteriores en los que se utilizaron frotis nasal⁵⁴ y aspirado nasal o esputo inducido⁵⁵ comprobaron la existencia de colonización transitoria en profesionales sanitarios, como médicos y enfermeras, que atendían a pacientes con PCP. Un amplio estudio que evaluó la presencia de colonización mediante la utilización de muestras de enjuague orofaríngeo de 164 profesionales sanitarios que desarrollaban su trabajo en diferentes áreas de un hospital universitario encontró una prevalencia de colonización del 8% entre los trabajadores que atendían a pacientes inmunodeprimidos y niños, los que podrían ser la fuente de infección para estos profesionales⁵⁶. A su vez, el personal sanitario colonizado puede convertirse también en una fuente de transmisión del hongo para individuos susceptibles dentro del ambiente hospitalario, como indica la reciente demostración de la capacidad de transmisión de *Pneumocystis* desde sujetos inmunocompetentes colonizados⁵⁷.
- d) En las mujeres embarazadas también se ha estudiado la colonización por *P. jirovecii* y se ha descrito una prevalencia del 15% en un estudio que evaluó a 33 gestantes en el tercer trimestre de embarazo⁵⁸. La colonización en esta población se ha relacionado con las alteraciones de la inmunidad celular y humoral que ocurren durante el embarazo y que podrían provocar algún grado de «leve deficiencia del sistema inmune»⁵⁹. Un punto importante para resaltar es que la colonización en las mujeres gestantes puede representar un reservorio con especial riesgo para transmisión al recién nacido. En este sentido, se demostró en un modelo animal que *Pneumocystis* podía detectarse en el frotis oral del 80% de los ratones 2 h después de su nacimiento y prácticamente en todos a las 48 h⁶⁰. En seres humanos se han descrito genotipos iguales del hongo en cuadros concomitantes de PCP de una madre y de su hijo de un mes de edad, lo que apoya la hipótesis de la transmisión maternofilial⁶¹.

Los datos de estudios recientes demuestran que los individuos sanos pueden ser colonizados y servir como reservorio para el hongo. En el modelo animal se demostró mediante PCR y estudios histológicos que *Pneumocystis* puede proliferar en el pulmón de ratones inmunocompetentes que actúan como reservorios y fuentes de infección⁶². En seres humanos, un único estudio ha detectado la presencia de ADN de *P. jirovecii* en el 20% de los lavados orofaríngeos de una muestra de 50 individuos sanos⁶³. Se necesitan estudios más amplios que establezcan la prevalencia de la colonización por *Pneumocystis* en la población general y sus implicaciones epidemiológicas.

La prevalencia de las infecciones oportunistas en los pacientes con sida cayó considerablemente después de la introducción del tratamiento antirretrovírico de alta eficacia⁶⁴. Por otro lado, la población de individuos susceptibles a PCP por otras causas de inmunosupresión parece estar aumentando, en virtud de los nuevos tratamientos que están surgiendo para diversas enfermedades, como ocurre en los pacientes trasplantados, que representan una de las poblaciones susceptibles con más riesgo⁶⁵. Más recientemente, varios estudios han observado la PCP como una infección oportunista con elevada mortalidad en pacientes con enfermedades reumatológicas y con enfermedad inflamatoria intestinal que han recibido tratamiento con agentes inmunosupresores, especialmente los agentes biológicos antifactor de necrosis tumoral α ^{66,67}. La detección de la colonización por

Pneumocystis en estos pacientes puede ser una buena estrategia para identificar sujetos con mayor riesgo de PCP. En este sentido, se ha propuesto la utilización de técnicas moleculares en enjuagues orofaríngeos como método de cribado para identificar la presencia de colonización antes de iniciar el tratamiento inmunosupresor^{68,69}.

Colonización y transmisión de un genotipo mutante

La asociación de trimetoprim con sulfametoxazol (TMS) es la primera opción para el tratamiento y la profilaxis de la infección por *P. jirovecii*⁷⁰. Ambos fármacos inhiben la síntesis del folato: la sulfamida interfiere en la acción de la dihidropteroato sintasa (DHPS) y el trimetoprim interfiere en la acción de la dihidrofolato reductasa. Según se ha demostrado en el modelo animal, la acción del TMS sobre *Pneumocystis* se debe a la actividad de la sulfamida⁷¹.

Se ha descrito la existencia de mutaciones puntuales de regiones conservadas del gen de la DHPS de diferentes microorganismos, como *Streptococcus pyogenes* o *Plasmodium falciparum*, que confieren resistencia a las sulfamidas^{72,73}. Mutaciones de este tipo se han identificado en aislados de *P. jirovecii* procedentes de pacientes con PCP, pero dado que *P. jirovecii* no puede cultivarse in vitro, los métodos tradicionales para medir la resistencia a fármacos no han podido emplearse. Estas mutaciones consisten en cambios puntuales de nucleótidos, que se traducen en sustituciones de aminoácidos en la enzima: 55 Thr→Ala y 57 Pro→Ser. La presencia de ambas mutaciones a la vez se ha vinculado a un mayor grado de resistencia⁷⁴. Los resultados de los estudios clínicos disponibles no han podido demostrar en todos los casos una peor respuesta al tratamiento de la PCP en los sujetos portadores de mutaciones^{75,76}, lo que parece indicar que las altas dosis de TMS utilizadas para el tratamiento de la PCP son capaces de superar el grado de resistencia conferido por estas mutaciones; sin embargo, el surgimiento de nuevas mutaciones podría cambiar esta situación⁷⁷.

Se ha descrito que hay diferencias geográficas en la prevalencia de estas mutaciones. En países desarrollados se ha observado la presencia de mutaciones hasta en un 91% de los sujetos con PCP que recibían quimioprofilaxis con sulfamidas⁷⁸. Por el contrario, en los países en vías de desarrollo la prevalencia en pacientes con PCP es muy baja, oscila entre un 0 y un 13,3% en estudios realizados en Asia, África y Sudamérica^{77–80}. No obstante, a pesar de la baja prevalencia referida, el avance en la epidemia de sida (especialmente en África) obliga a mantener la alerta para detectar un posible crecimiento de la resistencia de *P. jirovecii* a sulfamidas⁸¹.

Un aspecto importante para tener en cuenta es la posibilidad de que individuos colonizados por un genotipo mutante puedan transmitirlo a otros individuos susceptibles al desarrollo de PCP. En este sentido, los estudios que han vinculado la presencia de mutaciones de la DHPS con el lugar de residencia (y no con el lugar de nacimiento) apoyarían la hipótesis de la transmisión persona a persona³³. Entre los pacientes expuestos a profilaxis con TMS de 3 ciudades norteamericanas se observaron prevalencias de mutaciones del 54,2, el 77,8 y el 81,2%, respectivamente⁸². Un trabajo ha mostrado de forma preocupante que la transmisión de las mutaciones viene ocurriendo de manera significativa en la ciudad de San Francisco (EE. UU.), en la que el 71% de los casos de PCP en individuos con diagnóstico reciente de sida ya presentaban *Pneumocystis* con mutaciones de la DHPS⁸³. También se ha descrito la presencia de mutaciones en pacientes con EPOC, que podrían ser un importante reservorio para estos genotipos de *P. jirovecii* con mutaciones vinculadas a la resistencia a sulfamidas⁴⁵.

Perspectivas futuras

La colonización del ser humano por *P. jirovecii* ha despertado el interés de los investigadores que buscan comprender mejor el comportamiento de este hongo atípico. Es posible que estudios futuros en el área de la epidemiología molecular de *P. jirovecii* aporten más información en relación con la duración de la colonización en las diversas poblaciones citadas y con el papel que este microorganismo puede tener en la patogénesis de algunas enfermedades pulmonares crónicas, como la EPOC. La utilización de métodos no invasivos como el lavado orofaríngeo, que ha demostrado ser comparable al esputo o al lavado broncoalveolar para la detección de la colonización, ayuda a la realización de nuevos estudios que permitan profundizar en el conocimiento de la epidemiología de este patógeno.

Este microorganismo coloniza frecuentemente diversos grupos de población, y es posible erradicarlo con sulfamidas u otros fármacos. Se necesitan nuevas pruebas para comprobar la utilidad clínica de administrar tratamiento antimicrobiano para la colonización por *Pneumocystis*, pero es posible que sea beneficioso tratar con éstos a los individuos colonizados con riesgo de desarrollo de PCP (pacientes trasplantados, infectados por VIH, con neoplasias, enfermedades reumatológicas o digestivas) o para reducir daños potenciales en sujetos con enfermedades pulmonares crónicas. Por otra parte, los datos epidemiológicos disponibles hacen aconsejable plantear el aislamiento respiratorio de los pacientes con PCP para evitar el contagio de sujetos susceptibles de desarrollo de neumonía por parte de este patógeno; sin embargo, no hay estudios en la actualidad que hayan evaluado la eficacia de esta medida.

Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto ERA-NET “*Pneumocystis*-PathoGenoMics: Unravelling the Colonization-to-Disease Shift”. El Dr. Wissmann ha contado con la ayuda de una Beca de formación posdoctoral otorgada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Brasil (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq).

Bibliografía

- Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. Emerg Infect Dis. 2004;10:1713–20.
- Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature. 1988;334:519–22.
- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet. 1990;336:451–3.
- Cushion MT. Genetic heterogeneity of rat-derived *Pneumocystis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998;22:51–8.
- Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, Bridge PD, Hall GS, Hawksworth DL, et al. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the Uromyces-like red yeast fungi. Mol Microbiol. 1992;6:1903–11.
- Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, et al. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests co-evolution. J Clin Microbiol. 2001;39:2126–33.
- Peters SE, Wakefield AE, Whitwell KE, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* pneumonia in thoroughbred foals: Identification of a genetically distinct organism by DNA amplification. J Clin Microbiol. 1994;32:213–6.
- Keely S, Pai HJ, Baughman R, Sidman C, Sunkin C, Stringer JR, et al. *Pneumocystis* species inferred from analysis of multiple genes. J Eukaryot Microbiol. 1994;41(Suppl):94.
- English K, Peters SE, Maskell DJ, Collins ME. DNA analysis of *Pneumocystis* infecting a Cavalier King Charles spaniel. J Eukaryot Microbiol. 2001;48(Suppl):106.
- Hunter JA, Wakefield AE. Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species. J Eukaryot Microbiol. 1996;43(Suppl):24–5.

11. Ortiz-Rivera M, Liu Y, Felder R, Leibowitz MJ. Comparison of coding and spacer region sequences of chromosomal rRNA-coding genes of two sequenced *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol*. 1995;42:44–9.
12. Keely SP, Fischer JM, Cushion MT, Stringer JR. Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology*. 2004;150:1153–65.
13. Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Queener SF, Smith JW, Ortiz-Rivera M, et al. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 1994;32:2904–12.
14. Hsueh JY, Bohm RP, Didier PJ, Tang X, Lasbury ME, Li B, et al. Internal transcribed spacer regions of rRNA genes of *Pneumocystis carinii* from monkeys. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:503–8.
15. Banerji S, Wakefield AE, Allen AG, Maskell DJ, Peters S, Hopkin JM. The cloning and characterization of the *aro* gene of *Pneumocystis carinii*. *J Gen Microbiol*. 1993;139:2901–14.
16. Banerji S, Lugli EB, Miller RF, Wakefield AE. Analysis of genetic diversity at the *aro* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol*. 1995;42:675–9.
17. Ma L, Imamichi H, Sukura A, Kovacs JA. Genetic divergence of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in *Pneumocystis carinii* from 7 different host species. *J Infect Dis*. 2001;184:1485–8.
18. Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *J Infect Dis*. 1999;180:1969–78.
19. Stedman TT, Butler DR, Buck GA. The HSP70 gene family in *Pneumocystis carinii*: Molecular and phylogenetic characterization of cytoplasmic members. *J Eukaryot Microbiol*. 1998;45:589–99.
20. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis*. 1997;175:482–5.
21. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:891–6.
22. Keely SP, Stringer JR, Baughman RP, Linke MJ, Walzer PD, Smulian AG. Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. *J Infect Dis*. 1995;172:595–8.
23. Latouche S, Roux P, Poirot JL, Lavrard I, Hermelin B, Bertrand V. Preliminary results of *Pneumocystis carinii* strain differentiation by using molecular biology. *J Clin Microbiol*. 1994;32:3052–3.
24. Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Siracusano A, Tamburrini E, et al. Biodiversity of French and Italian human *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol*. 1996;43(Suppl):54–5.
25. Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburrini E, Siracusano A, et al. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: Typing with different DNA regions. *J Clin Microbiol*. 1997;35:383–7.
26. Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* sp. *hominis*: High genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol*. 1998;36:90–3.
27. Wakefield AE, Fritscher CC, Malin AS, Gwanzura L, Hughes WT, Miller RF. Genetic diversity in human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from four geographical locations shown by analysis of mitochondrial rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol*. 1994;32:2959–61.
28. Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, et al. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 1998;36:734–41.
29. Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. *J Infect Dis*. 1996;174:141–56.
30. Beser J, Hagblom P, Fernandez V. Frequent in vitro recombination in internal transcribed spacers 1 and 2 during genotyping of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol*. 2007;45:881–6.
31. Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *J Clin Microbiol*. 1997;33:2745–7.
32. Vargas SL, Hughes WT, Wakefield AE, Oz HS. Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *J Infect Dis*. 1995;172:506–10.
33. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: Implications for transmission. *Emerg Infect Dis*. 2000;6:265–72.
34. Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1754–9.
35. Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44(Suppl):28.
36. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa A, Ponce CA, Cabrera CE, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis*. 2001;32:855–61.
37. Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard JC, Journeaux V, Racurt C, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:667–73.
38. Totet A, Duwat H, Magois E, Journeaux V, Roux P, Racurt C, et al. Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection. *Microbiology*. 2004;150:1173–8.
39. Peterson JC, Cushion MT. *Pneumocystis*: Not just pneumonia. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8:393–8.
40. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis*. 2008;197:10–7.
41. Davis JL, Welsh DA, Beard CB, Jones JL, Lawrence GG, Fox MR, et al. *Pneumocystis* colonization is common among hospitalized HIV-infected patients with non-*Pneumocystis* pneumonia. *Thorax*. 2008;63:329–34.
42. Morris A, Kingsley LA, Groner G, Lebedeva IP, Beard CB, Norris KA. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV infected-men. *AIDS*. 2004;18:793–8.
43. Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, Denis CM, Miller R. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis*. 2003;187:901–8.
44. Montes-Cano MA, De la Horra C, Martín-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaliza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis*. 2004;39:123–8.
45. Calderón E, De la Horra C, Medrano FJ, López-Suárez A, Montes-Cano MA, Respaliza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:545–9.
46. Respaliza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, De la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, et al. Prevalence of colonization and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:1012–5.
47. Vidal S, De la Horra C, Martín J, Montes-Cano MA, Rodríguez E, Respaliza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:231–5.
48. Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JCT, Wakefield AE, Miller RF, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: A prospective study. *Thorax*. 2003;58:594–7.
49. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin II WJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia: Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:1204–9.
50. Patil SP, Board KF, Lebedeva IP, Norris KA. Immune response to *Pneumocystis* colonization and infection in a simian model of AIDS. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50(Suppl):661–2.
51. Norris KA, Morris A, Patil S, Fernandes E. *Pneumocystis* colonization, airways inflammation and pulmonary decline function in acquired immunodeficiency syndrome. *Immunol Res*. 2006;36:175–87.
52. Morris A, Sciarba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott M, Hogg JC, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Crit Respir Care Med*. 2004;170:408–13.
53. Lundgren B, Elvin K, Rothman LP, Ljungström I, Lidman C, Lundgren JD. Transmission of *Pneumocystis carinii* from patients to hospital staff. *Thorax*. 1997;52:422–4.
54. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Muñoz MP, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1536–8.
55. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3877–82.
56. Durand-Joly I, Soula F, Chabé M, Dalle JH, Lafitte JJ, Senechal M, et al. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: A challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50(Suppl):614–5.
57. Rivero L, De la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaliza N, Friaza V, et al. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1116–8.
58. Vargas SL, Ponce CA, Sánchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juárez G. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis*. 2003;5:605–6.
59. Claman HN. The immunology of human pregnancy. Totowa (NJ): Humana Press; 1993.
60. Icenhour CR, Rebholz S, Collins MS, Cushion MT. Evidence for early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats using PCR and oral swabs. *Eukaryotic Cell*. 2002;1:414–9.
61. Miller RF, Ambrose HE, Novelli V, Wakefield AE. Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1555–7.
62. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaliza N, Camus D, et al. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: Histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:89–97.
63. Medrano FJ, Montes-Cano MA, Conde M, De la Horra C, Respaliza N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:245–50.
64. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederik T, Bertolli J, Lindegren ML, et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2000;30:55–145.

65. Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1098–107 [Erratum, *Clin Infect Dis*. 2002;34:1293].
66. Kaur N, Mahl TC. *Pneumocystis jirovecii* (carinii) pneumonia after infliximab therapy: A review of 84 cases. *Dig Dis Sci*. 2007;52:1481–4.
67. Poppers DM, Scherl EJ. Prophylaxis against *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease: Toward a standard of care. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:106–13.
68. Wissmann G, Varela JM, Calderón E. Prevention of *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease based on the detection of *Pneumocystis* colonization. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1751–2.
69. Wissmann G, Garrido IM, Respaldiza N, Varela JM, Calderón E. Identification of *Pneumocystis* colonization in patients treated with infliximab. *Ann Rheum Dis*. 2008. 4 Feb, Eletter.
70. Ioannidis JP, Cappelleri JC, Skolnik PR, Lau J, Sacks HS. A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of *Pneumocystis carinii* prophylactic regimens. *Arch Intern Med*. 1996;156:177–88.
71. Walzer PD, Foy J, Steele P, Kim CK, White M, Klein RS, et al. Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:1935–42.
72. López P, Espinosa M, Greenberg B, Lacks SA. Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthase and characterization of the enzyme. *J Bacteriol*. 1987;169:4320–6.
73. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: Dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem*. 1994;224:397–405.
74. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis*. 2000;182:551–7.
75. Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet*. 1999;354:1347–51.
76. Navin TR, Beard CB, Huang L, Del Rio C, Lee S, Pieniazek NJ, et al. Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: A prospective study. *Lancet*. 2001;358:545–9.
77. Kazanjian PH, Fisk D, Armstrong W, Shulin Q, Liwei H, Zhang Ke, et al. Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. *J Infect Dis*. 2004;189:1684–7.
78. Crothers K, Huang L, Morris A, Fox M, Groner G, Turner J, et al. *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutations in patients with *Pneumocystis* pneumonia who are newly diagnosed with HIV infection. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50(Suppl):609–10.
79. Zar HJ, Álvarez-Martínez MJ, Harrison A, Meshnick SR. Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1047–51.
80. Wissmann G, Álvarez-Martínez MJ, Mesnhick SR, Diehl AR, Prolla JC. Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol*. 2006;53:305–7.
81. Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*. 2003;36:70–8.
82. Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis*. 2000;182:1192–8.
83. Crothers K, Huang L, Morris A, Fox M, Groner G, Turner J, et al. *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutations in patients with *Pneumocystis* pneumonia who are newly diagnosed with HIV infection. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50(Suppl):609–10.