RPDI
Janeiro > Abril 2014 / Vol. 10 > N.º 1

ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

Pneumocystis e pneumocistose: o agente patogénico e a doença

(105 anos de investigação)

Pneumocystis and pneumocystosis: the pathogen and the disease

(105 years of research)

/ F. Esteves[1] / F. Antunes[2] / O. Matos[3]

[1]Pós-doutorado do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, Unidade de Parasitologia Médica
[2]Especialista em Doenças Infecciosas e Medicina Tropical, Professor Catedrático Jubilado da Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa.
[3]Professora Associada com Agregação do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, Unidade de Parasitologia Médica

Correspondência:
Olga Matos
Unidade de Parasitologia Médica
Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários - CMDT
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade Nova de Lisboa
Telef: (351) 21 365 26 00
Fax: (351) 21 363 21 05
email: omatos@ihmt.unl.pt.

Artigo recebido em
06/01/2014

Artigo aceite para publicação em
21/2/2014

/ Resumo

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (pneumocistose ou PPc) é um importante factor de morbilidade e mortalidade nos doentes com a síndroma de imunodeficiência adquirida (sida). A pneumocistose é, também, um problema emergente nos imunocomprometidos, seronegativos para vírus da imunodeficiência humana (VIH), devido ao número crescente de doentes imunocomprometidos, incluindo aqueles sob terapêutica imunossupressora.
Na década de 80 do século passado, com a epidemia da sida, a pneumocistose era responsável por cerca de dois terços das infecções definidoras de sida, sendo que 80% dos infectados por VIH desenvolvia, pelo menos, um episódio de pneumocistose que, em 20 a 25% dos casos, era mortal. O uso de quimioprofilaxia anti-*P. jirovecii*, estabelecida no início dos anos 90, do século passado, e a introdução da terapêutica antirretrovírica (TARV), em meados da mesma década, permitiram um melhor controlo da doença na América do Norte e na Europa Ocidental. No entanto, parte dos casos de pneumocistose ilustram desigualdades no acesso aos cuidados de saúde naquelas regiões do Mundo ou em alguns grupos sociais, mas também, dificuldades na implementação de métodos de diagnóstico adequados, devido à falta recorrente de recursos. Assim, o diagnóstico definitivo da pneumocistose baseia-se em métodos citoquímicos de coloração, imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM) e técnicas moleculares, aplicados a produtos biológicos de obtenção mais ou menos invasiva, processo que exige recursos e pessoal especializado.
Recentemente, diversos marcadores serológicos de infecção por *P. jirovecii* têm sido estudados, com o objectivo de desenvolver um método de diagnóstico da pneumocistose, com recurso a amostras biológicas obtidas de forma minimamente invasiva, como é o caso do sangue.

Palavras-chave: *Pneumocystis jirovecii*; Pneumocistose (Pneumonia por *Pneumocystis*); VIH/sida; epidemiologia; diagnóstico.

/ Abstract

Pneumocystis jirovecii pneumonia (pneumocystosis or PcP) is a significant cause of morbidity and mortality in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS) patients. PcP is also an emerging problem among HIV seronegative immunocompromised patients due to the rising number of patients receiving immunosuppressive therapies. In the 1980s, along with the HIV/AIDS epidemic, PcP was the cause of one third of the AIDS-indicative diseases diagnosed. In those days, 80% of the HIV-infected patients had at least one episode of PcP that in 20 to 25% of the cases led to death. In the 1990s, the widespread of the anti-P. jirovecii chemoprophylaxis and the highly active antiretroviral therapy (HAART) allowed the improvement of PcP control in the U.S.A and Western Europe. However, a significant percentage of the PcP cases worldwide demonstrate the difficulties of some populations or social groups to access appropriate healthcare services. Several methods have been established for the diagnosis of PcP, including cytochemical staining, immunofluorescent staining with monoclonal antibodies, and molecular techniques. Those methods require resources and specialized personnel. Recently, some candidate molecules have been studied in order to develop a diagnostic method using less invasive samples, such as blood.

Key-words: *Pneumocystis jirovecii; PcP (Pneumocystis pneumonia or pneumocystosis); HIV/AIDS; epidemiology; diagnosis.*

/ Introdução

Pneumocystis jirovecii (anteriormente designado por *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*) destaca-se pela relevância e impacte no contexto da infecção por vírus da imunodeficiência humana/síndroma de imunodeficiência adquirida (VIH/sida). *P. jirovecii* também tem sido detectado em doentes não infectados por VIH, com graus moderados de imunodeficiência, e mesmo em imunocompetentes. O número crescente de doentes sob terapêuticas imunossupressoras para tumores, transplante de órgãos e doenças auto-imunes, tem como consequência que a pneumocistose tenha importância acrescida nesta população, seronegativa para VIH. *P. jirovecii* é um agente patogénico oportunista, eucariota unicelular de distribuição ubíqua e com especificidade restrita para o Homem. Pelas suas características biológicas e devido ao seu tropismo para o pulmão, *P. jirovecii* causa, em regra, pneumonia intersticial grave, conhecida por pneumocistose ou pneumonia por *Pneumocystis* (PPc), nos imunocomprometidos e, por norma, infecção assintomática nos imunocompetentes[1, 2, 3, 4].

Após mais de um século de conhecimento, período que vai desde a descoberta do microrganismo, em 1909, até à actualidade, a classificação taxonómica de *Pneumocystis* permanece uma área do saber controversa, não se percebendo, ainda ao certo, qual é a verdadeira natureza do microrganismo. Passados 104 anos sobre a sua descoberta, permanece a polémica a propósito da classificação de *Pneumocystis*[5, 6]. Até à década de 80, do século passado, a qualificação filogenética de *Pneumocystis* como protozoário, foi baseada nas análises morfológicas, nas necessidades bioquímicas e na resposta (susceptibilidade) à acção de agentes quimioterapêuticos. Nos últimos anos, como consequência da utilização de técnicas de biologia molecular, *Pneumocystis* foi classificado como um fungo. Porém, trata-se de um fungo "atípico", pois é susceptível a antiparasitários, como a pentamidina ou a primaquina, mas, por não conter ergosterol na membrana celular, *P. jirovecii* não é susceptível à acção da maioria dos antifúngicos, como é o caso da anfotericina B. Os resultados dos últimos 20 anos de investigação fizeram despontar outras questões de grande interesse, tais como: a) qual é o tipo de fungo em que se englobam as espécies do género *Pneumocystis*; b) qual é o espectro de variação e heterogeneidade dentro do grupo conhecido de organismos identificados como *Pneumocystis*; c) qual é a importância da investigação e da compreensão desta variação, para melhor interpretar os comportamentos deste microrganismo[5].

Durante os últimos 30 anos a pneumocistose revelou-se como uma doença de extrema importância, associada à epidemia da infecção VIH/sida. Por se tratar de uma infecção oportunista com características específicas, durante os primeiros anos da epidemia

VIH/sida, a pneumocistose comportou-se como o principal indicador associado à infecção por VIH, passando nos últimos anos a ter um papel relevante na clínica dos seropositivos para VIH. Dados recentes do relatório europeu de vigilância sobre VIH/sida de 2012, do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), mostram que no espaço económico europeu, em 2012, a doença definidora de sida mais comum foi a pneumocistose com 25% dos casos, seguida da candidose esofágica com 13% e da tuberculose pulmonar com 10%, demonstrando, assim, que a pneumocistose permanece como uma causa de morbilidade e de mortalidade significativa nos doentes com VIH/sida, mesmo após 1996, na era da terapêutica antirretrovírica de combinação (TARVc)[7].

Pneumocystis foi descoberto por Carlos Chagas (Brasil) no início de século XX, mais precisamente em 1909, quando ao observar uma forma morfológica, nunca antes identificada, em tecido pulmonar de porquinhos-da-índia, utilizados como modelo animal para o estudo da tripanossomose humana americana, ou doença de Chagas, depreendeu que esta estrutura poderia corresponder a uma fase do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Um ano depois, Antonio Carini descreveu estruturas similares em tecido de pulmão de ratos infectados por *Trypanosoma lewisi* e suspeitou que a forma morfológica visualizada poderia dizer respeito a um novo microrganismo. Em 1912, no Instituto Pasteur de Paris, um estudo mais minucioso do material biológico proveniente das investigações de Carini, foi conduzido pelo casal Delanoë. Assim, foi possível a confirmação de que se tratava de uma entidade biológica nova, não só pela observação do tecido pulmonar, das amostras enviadas por Carini mas, também, pela identificação dessas mesmas estruturas em pulmão de ratos sem infecção por *Trypanosoma*. Aqueles investigadores chegaram, então, à conclusão de que o organismo em questão era claramente distinto de *Trypanosoma* e, desde logo, atribuíram-lhe a designação de *Pneumocystis*, por ter sido isolado no pulmão, e o restritivo específico *carinii*, homenageando António Carini, que havia permitido tal investigação. Os organismos do género *Pneumocystis* foram então descritos como pequenas estruturas, densas e altamente refringentes, em forma de quistos esféricos[8, 9, 10, 11].

/ Estado da arte

Epidemiologia da pneumocistose

Durante as décadas que se seguiram, foram encontrados microrganismos sob a forma de quistos, muito similares aos definidos pelo casal Delanoë, verificando-se que a sua ocorrência poderia estar associada a casos de pneumonia, num alargado leque de espécies de mamíferos[6, 12]. *Pneumocystis* foi reconhecido como potencial agente infeccioso para o Homem, quando nas décadas de 30 e 40, do século passado, lhe foram atribuídos vários casos de doença e, mesmo, alguns surtos de pneumonia intersticial em crianças desnutridas e prematuras, muitas delas acolhidas em orfanatos, como consequência das dificuldades sociais extremas, devido à segunda guerra mundial[12, 13]. No entanto, somente no decorrer dos anos 50, do mesmo século, os estudos dos investigadores checos Josef Vanek e Otto Jírovec demonstraram e estabeleceram em definitivo as características infecciosas de *Pneumocystis*, para o Homem[14, 15]. Então, tornou-se evidente que os doentes que desenvolviam pneumocistose apresentavam características clínicas comuns, que, de alguma forma, eram consequência da debilidade do sistema imunitário, quer devido a anomalias congénitas, como a hipogamaglobulinemia e, nalgumas crianças, em consequência da malnutrição, quer pela acção da terapêutica imunossupressora[1, 2, 16].

Posteriormente, nos anos 70, retomou-se o interesse no estudo da pneumocistose. Nesta altura, *P. jirovecii* tornou-se causa frequente de pneumonia intersticial em doentes imunocomprometidos, devendo-se então este facto ao aumento considerável do número de doentes com imunossupressão grave, em particular receptores de transplantes de órgãos, sob terapêutica imunossupressora e doentes oncológicos, sujeitos a quimioterapia e a radioterapia. Por outro lado, foi, então, investigada uma combinação de antimicrobianos, o trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ), que demonstrou ser eficaz no tratamento da pneumocistose, permitindo maior eficácia no controlo da doença, com resultados promissores na evolução da patologia provocada por este microrganismo, e o melhor acompanhamento da clínica dos doentes[2, 17].

Com o início da epidemia da sida, deu-se uma alteração significativa na incidência de pneumocistose, nos países ocidentais industrializados, passando de uma doença rara para uma pneumonia comum nesta população de doentes. Ficou evidente a ocorrência de pneumocistose em grupos de indivíduos com comportamentos específicos, como por exemplo, homossexuais e utilizadores de drogas intravenosas. De resto, a pneumocistose foi das primeiras patologias diagnosticadas nos primeiros casos de doentes com sida. O primeiro relato relacionado com uma potencial síndroma de imunodeficiência humana é de 1981, em que os *Centers for Disease Prevention and Control* (CDC) confirmaram os primeiros casos de pneumocistose, entre Outubro e Maio do mesmo ano, em cinco jovens homossexuais do sexo masculino, na cidade de Los Angeles, alertando para a possibilidade de se estar perante uma disfunção celular imunitária (ainda de etiologia desconhecida)[18]. A partir desta descrição, e tendo em conta o contexto epidémico VIH/sida que se seguiu, a pneumocistose passou a ter enorme relevância e *Pneumocystis* ganhou o estatuto de microrganismo oportunista. Esta patologia passou a ser uma das prioridades do ponto de vista epidemiológico e clínico no seguimento dos doentes com infecção por VIH. Antes de serem adoptadas as recomendações para a profilaxia desta doença, 80% dos infectados por VIH desenvolvia, pelo menos, um episódio de pneumocistose que, em 60% dos casos representava a doença definidora de sida e em 20 a 25% dos doentes era mortal. Devido à contínua degradação do estado imunitário dos doentes com sida, 60% dos que recuperavam de um episódio recaiam da

QUADRO I – PRINCIPAIS FÁRMACOS COM ACÇÃO ANTI-P. JIROVECII, ALVOS METABÓLICOS DA ACÇÃO ANTIMICROBIANA, EVIDÊNCIAS DE SUSPEITA DE RESISTÊNCIA E CRITÉRIOS DE UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA E PROFILÁCTICA NA PNEUMOCISTOSE.

Fármaco	Alvo molecular	Suspeita de resitência	Tipo de pneumocistose	Terapêutica	Profilaxia
TMP-SMZ	DHPS/DHFR	Mutações no gene DHPS	Ligeira a severa	Primeira linha	Primeira linha
Pentamidina	tRNA	Suspeita de resistência clínica	Ligeira a severa	Segunda linha	Raro
Primaquina-clindamicina	Síntese proteica e cadeia respiratória	Sem evidências	Ligeira a moderada	Segunda linha	Sem aplicação
Atovaquona	Citocrómio b	Mutações no local de ligação da co-enzima Q	Ligeira a moderada	Alternativa de segunda linha	Alternativa de segunda linha
Dapsona-TMP	DHPS/DHFR	Mutações no gene DHPS	Ligeira a moderada	Alternativa de segunda linha	Alternativa de segunda linha

Legenda: TMP (trimetoprim); SMZ (sulfametoxazol); DHPS (dihidropteroato sintetase); DHFR (dihidrofolato sintetase); tRNA (ácido ribonucleico de transferência).

pneumocistose. A gravidade da pneumonia obrigava ao recurso do suporte de ventilação mecânica, num número substancial de doentes, internados em unidades de cuidados intensivos. Nalguns centros, a taxa de mortalidade por esta patologia, nos doentes com suporte de ventilação mecânica, ultrapassava os 80%[2, 19, 20]. Na última década do século passado, grande parte da investigação efectuada na área da sida focou-se na problemática da pneumocistose, a infecção oportunista que mais atingia os seropositivos para VIH. Os resultados destes estudos permitiram melhorar os métodos de diagnóstico, de profilaxia e de tratamento.

Nos países industrializados, o uso generalizado da quimioprofilaxia recomendada para a pneumocistose, estabelecida no início dos anos 90 e, mais tarde, a TARVc, permitiram o decréscimo na incidência da pneumocistose. Nos últimos anos, verificaram-se progressos significativos no diagnóstico, na profilaxia e no tratamento da pneumocistose, em paralelo com a melhoria clara no tratamento e no acompanhamento dos doentes com sida. Esta evolução sinérgica teve como consequência a redução da incidência da pneumocistose nos infectados por VIH e o aumento da esperança média de vida dos doentes com esta pneumonia. No quadro 1, estão referidos os fármacos anti-*Pneumocystis* disponíveis, bem como algumas das características e recomendações para a sua utilização.

O primeiro grande impacto na redução da incidência da pneumocistose deu-se devido à introdução da profilaxia contra a pneumocistose, iniciada, ainda, no final da década de 80. As percentagens de casos de pneumocistose nos E.U.A., diminuíram de 53% em 1989, para 42% em 1992[2, 21]. Num estudo europeu, que englobou nove países, incluindo Portugal, verificou-se que o risco de pneumocistose, no momento do diagnóstico de sida, diminuiu de 38%, em 1988, para 31% em 1992[22]. Com a introdução da TARVc, em 1996, verificou-se uma redução clara das doenças oportunistas, do ponto de vista geral e, em particular, da pneumocistose. Nos E.U.A., em adultos, calcula-se que a frequência da pneumocistose tenha sofrido um decréscimo de 3,4% ao ano, entre 1992 e 1995, e de 21,5% ao ano, entre 1996 e 1998[23]. Na Europa, a incidência de pneumocistose decresceu de 4,9 casos por 100 pessoas/ano em Março de 1995, para 0,3 casos por 100 pessoas/ano em Março de 1998, observando-se, tal como nos E.U.A., alterações significativas na incidência desta infecção oportunista, após a introdução da TARVc[24, 25].

Contudo, a pneumocistose, permanece como um problema clínico importante, mantendo-se como uma das principais doenças oportunistas que afectam os infectados por VIH. Actualmente, uma percentagem dos casos de pneumocistose, ilustram as desigualdades no acesso aos cuidados de saúde nalgumas regiões do Mundo ou nalguns grupos populacionais, para os quais o diagnóstico da pneumocistose é feito numa fase já muito tardia da doença[2, 26]. Nos países industrializados, a pneumocistose representa, ainda, uma causa significativa de morbilidade e de mortalidade nos doentes com sida, ocorrendo predominantemente em doentes que não têm acesso ou que não recorrem a cuidados de saúde, a maioria, desconhecendo que está infectada por VIH e, também, em doentes que, apesar do acesso aos cuidados de saúde, não aderem aos programas de prevenção/acompanhamento da doença[2, 27].

A infecção por *P. jirovecii* não se encontra confinada aos países industrializados. Alguns estudos indicam que em países em desenvolvimento como o Quénia, República Democrática do Congo (antigo Zaire), África do Sul e México, são encontradas taxas elevadas de seroprevalência, em adultos, idênticas às observadas nos E.U.A. e na Europa, até aos anos 90 do século passado[28]. Em contraste com a melhoria significativa dos cuidados de saúde para os infectados por VIH, nos países industrializados, a sida continua como a mais devastadora epidemia noutras regiões do globo, mais especificamente nos países com baixo-médio rendimento. A *Joint Uniteds Nations Programme on HIV/AIDS*

(UNAIDS) estima que cerca de 35 milhões de pessoas estejam infectadas por VIH e que 90 a 95% destes infectados vivam em países de baixo-médio rendimento[29]. A dificuldade em implementar cuidados de saúde adequados, que comportem a TARVc e a profilaxia da pneumocistose, nestas regiões, é evidente. Associada à sida, a pneumocistose começa a ser conhecida como uma infecção frequente nestes países, estando subdiagnosticada e consequentemente subestimada[26, 29].

Os poucos estudos realizados na América Latina indicam que, apesar de se verificar grande heterogeneidade na prevalência da infecção por VIH e na disponibilidade da TARVc, a frequência de pneumocistose varia entre os 6% e os 55%. No Brasil, a prevalência da pneumocistose, nos doentes com sida, atinge os 55% e nos países da América Central, situa-se entre os 24 e 29%[30, 31]. Durante as duas primeiras décadas da epidemia VIH/sida, a pneumocistose raramente foi reportada na África sub-sariana onde, na realidade, a maioria dos doentes VIH/sida vivem (cerca de 25 milhões)[29]. Estudos recentes, realizados na África subsariana, revelam taxas de frequência de pneumocistose altas em adultos e em crianças, com taxas de mortalidade de cerca de 50%, contrariando os resultados de estudos anteriores que relatavam taxas de frequência mais baixas (entre 5 e 11%) de pneumocistose, em adultos seropositivos para VIH[2, 26, 30]. Os resultados de dois estudos realizados no Zimbabué e no Uganda mostraram frequências altas de pneumocistose de 33 e de 39%, respectivamente[32, 33]. Estudos anteriores podem, muito provavelmente, ter subestimado as prevalências da pneumocistose em África. A detecção de baixas frequências desta doença neste continente, pode ser devida a diversos factores que possam ter tido por consequência as baixas estimativas dos casos de pneumocistose, como os limitados recursos financeiros e técnicos para o diagnóstico e a carência de pessoal habilitado e experiente que permita o diagnóstico laboratorial de forma correcta. As taxas altas de tuberculose e de outras pneumonias bacterianas, que se verificam na população adulta africana infectada por VIH, resultam, grande parte das vezes, na morte destes doentes, mesmo antes deles atingirem um patamar de imunodeficiência (alto risco), no qual é comum a ocorrência de infecções oportunistas, como a pneumocistose[2, 26].

/ Diagnóstico da pneumocistose

Ao contrário do que acontece para a maioria dos microrganismos patogénicos, a inexistência de um processo sustentado, estável e reprodutível de cultura de *P. jirovecii* é uma importante limitação para várias áreas de estudo da pneumocistose[4, 6]. A tentativa de conseguir a propagação sustentada de *Pneumocystis*, fora do ambiente pulmonar do hospedeiro, tem sido extensivamente estudada, por variadas técnicas, mas sem sucesso, dificultando bastante o seu estudo. No entanto, a evolução e o aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico clássicos e a aplicação das novas técnicas, na área da biologia molecular, vieram permitir, não só a melhoria na identificação (sensibilidade e especificidade) de *P. jirovecii* em amostras clínicas, como, também, o estudo da heterogeneidade genética inter e intra-hospedeiro. Alguns indicadores clínicos têm vindo a ser associados com a evolução e desfecho dos casos de infecção por *P. jirovecii* [1, 2, 27]. No entanto, permanecem por esclarecer as razões pelas quais alguns doentes evoluem com um grau moderado de gravidade de pneumocistose, com resposta favorável à terapêutica anti-*Pneumocystis*, enquanto outros apresentam quadros graves de pneumocistose, que pode ser fatal, apesar da terapêutica. Estudos recentes sugerem que estas diferenças poderão estar relacionadas com determinados polimorfismos que ocorrem em *loci* específicos do microrganismo[34, 35]. As novas ferramentas moleculares possibilitam a identificação de diferentes subtipos de *P. jirovecii* e o reconhecimento de determinadas características moleculares, associadas ao perfil epidemiológico e a determinados parâmetros clínicos, tais como a distribuição geográfica, resistência potencial a fármacos, graus distintos de gravidade da doença e modos de transmissão[1, 34, 35]. Recentemente, foram desenvolvidas metodologias de genotipagem de alto rendimento, como a PCR-*multiplex*/polimerização de base única (MPCR/SBE, do inglês *single base extension*), que, quando associadas, possibilitam a identificação simultânea de vários *loci* polimórficos de *P. jirovecii*, potencialmente relacionados com parâmetros clínicos da infecção, tais como a patogenicidade ou a resistência a fármacos. No entanto, ainda não foi validada nenhuma técnica que permita o prognóstico da pneumocistose, com base na caracterização genética dos respectivos isolados[35].

Para o diagnóstico presuntivo da pneumocistose, são considerados diversos parâmetros clínicos, que no seu conjunto podem ser sugestivos da doença. A apresentação do quadro clínico, os testes de função pulmonar, a gasometria arterial em repouso e após exercício, os exames radiológicos e laboratoriais de rotina, são os elementos que permitem a orientação do diagnóstico presuntivo. O quadro clínico de um doente com pneumocistose inclui febre, tosse não produtiva e dispneia. A apresentação radiológica mais comum desta patologia traduz-se por um padrão de pneumonia intersticial bilateral, podendo no entanto variar em função do grau de imunossupressão, da presença de outras infecções concomitantes ou da utilização da pentamidina na profilaxia da pneumocistose. A gasometria arterial revela hipoxemia que se agrava com o exercício. Uma pressão parcial do oxigénio no sangue periférico (PaO_2) inferior a 65 mmHg, num doente com suspeita clínica e radiológica, é sugestiva de pneumocistose[1, 27]. Adicionalmente, a avaliação do estado imunitário do doente é um parâmetro importante na determinação do risco que este tem de adquirir a pneumocistose. Este risco aumenta consideravelmente quando a contagem de linfócitos do fenótipo $TCD4^+$, no sangue periférico, é inferior a 200 células/mm^3 [1, 4, 27].

O diagnóstico laboratorial e definitivo da pneumocistose baseia-se em métodos citoquímicos de coloração, imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM) e técnicas

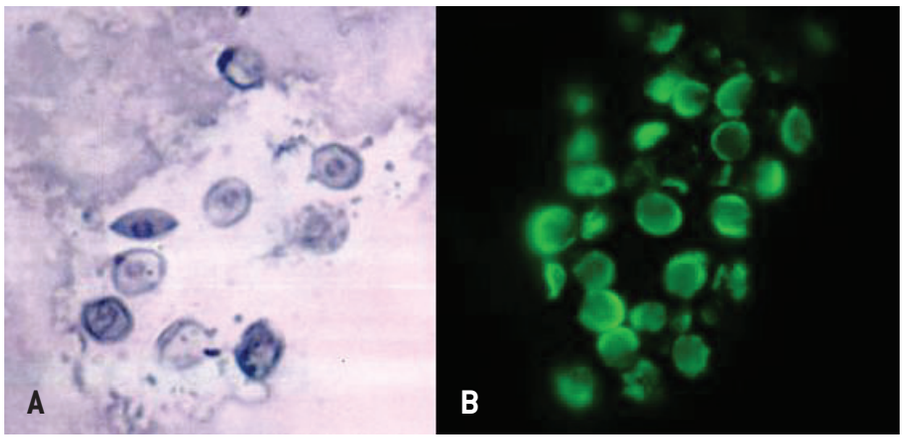

Figura 1. Quistos de *P. jirovecii* corados por duas técnicas de referência para o diagnóstico definitivo da pneumocistose em espécimes pulmonares. Fotografia (A): formas quísticas coradas pela técnica de metenamina prata e observadas por microscopia óptica (x1000) (original dos autores)]. Fotografia (B): formas quísticas coradas pela técnica de IFI/AcM e observadas por microscopia de fluorescência (x1000) (original dos autores).

moleculares, como a reacção de polimerização em cadeia (PCR), ou a PCR em tempo real (RT-qPCR). Na figura 1, podem observar-se quistos de *Pneumocystis*, corados por duas técnicas de referência e visualizados por microscopia. Amostras do tracto respiratório inferior, como o lavado broncoalveolar ou a expectoração induzida, são os indicados para o diagnóstico desta doença. Estas amostras biológicas são colhidas por técnicas invasivas e, por isso, não são fáceis de obter ou de repetir em doentes com pneumocistose, em particular nos doentes com insuficiência respiratória grave. Nos países considerados de baixo--médio rendimento, junta-se aos problemas acima enumerados, a dificuldade de implementar técnicas de diagnóstico laboratorial e métodos para obtenção de amostras pulmonares, pois ambos requerem pessoal especializado, equipamento dispendioso e estruturas que, na maioria dos casos, não fazem parte da realidade vivida no terreno[4, 26, 36].

A detecção rápida e eficaz do agente causal, com recurso a métodos pouco onerosos e a amostras biológicas obtidas de forma minimamente invasiva, como o sangue, torna-se premente. Diversos marcadores serológicos têm sido estudados e a sua importância discutida em termos de aplicação ao diagnóstico da pneumocistose. Moléculas do próprio microrganismo, como o beta-d-glucano (BG), abundante na parede dos quistos de *Pneumocystis* e as glicoproteínas de superfície *MSG* (do inglês, *Major Surface Glycoproteins*), características da superfície do microrganismo, ou moléculas do hospedeiro, como a lactato desidrogenase (LDH), enzima citoplasmática libertada para o meio intercelular após destruição da membrana celular devida a lesão do tecido pulmonar e o antigénio *Krebs von den Lungen*-6 (KL-6), glicoproteína membranar expressa nos pneumócitos tipo II, cujos níveis são elevados no contexto de lesão pulmonar aguda, são potenciais candidatos para serem utilizados como biomarcadores no âmbito do diagnóstico serológico da pneumocistose. Moléculas específicas, que apresentam níveis distintos de concentração serológica durante a infecção por *P. jirovecii*, podem, por hipótese, estar em circulação no sangue dos doentes, sendo possível a sua detecção e mensuração por técnicas serológicas sensíveis e específicas de imunodetecção ou de cinética enzimática. De entre estes candidatos, o BG surge como o biomarcador mais promissor e com o maior potencial de investigação. Diversos estudos revelaram boa correlação entre os níveis de BG no soro e a gravidade da doença, mostrando também capacidade para distinguir entre infecção por *P. jirovecii* e outras infecções fúngicas, frequentes em doentes imunocomprometidos[4, 36, 37]. Apesar de ainda não haver nenhuma técnica serológica validada para o diagnóstico da pneumocistose, os resultados dos diversos estudos apontam para que biomarcadores, como o BG, possam ser utilizados como alternativa, não só no diagnóstico da primo-infecção, como no rastreio da pneumocistose, nos imunocomprometidos, com e sem infecção por VIH[36, 37]. Estes ou outros biomarcadores, cujos níveis possam ser medidos no soro, poderão no futuro ser utilizados, como rotina para o diagnóstico não invasivo da pneumocistose.

/ Patrocínios

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/SAU-MIC/116716/2010)

Associação para Investigação e Desenvolvimento da Faculdade de Medicina (AIDFM)

/ Bibliografia

1. Barry SM, Johnson MA. "*Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management". *HIV Med.* 2001;2:123-132.

2. Morris A, Lundgren JD, Masur H, *et al.* "Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia". *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1713-1720.

3. Matos O, Costa MC, Correia I, *et al.* "*Pneumocystis jiroveci* infection in immunocompetent patients with pulmonary disorders, in Portugal". *Acta Med Port.* 2006;19:121-126.

4. Calderón EJ, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. "*Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment". *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8:683-701.

5. Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. "*Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications". *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53:2-11.

6. Aliouat-Denis CM, Chabe M, Demanche C, *et al.* "*Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power". *Infect Genet Evol.* 2008;8:708-726.

7. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), World Health Organization (WHO). 2013. *HIV/AIDS surveillance in Europe 2012.* (http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/235440/e96953.pdf)

8. Chagas C. "Nova tripanozomiaza humana". *Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro).* 1909;1:159-218.

9. Carini A. "Formas des eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*". *Soc Med Cir São Paulo.* 1910;38:8.

10. Delanoë P, Delanoë M. "Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *trypanosoma Lewisii*". *C R Acad Sci (Paris).* 1912;155:658-660.

11. Vavra J, Kucera K. "*Pneumocystis carinii delanoe*, its ultrastructure and ultrastructural affinities". *J Protozool.* 1970;17:463-483.

12. Van der Meer G, Brug SL. "Infection par *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux". *Ann Soc Belg Med Trop.* 1942 ;22:301-307.

13. Gajdusek DC. "*Pneumocystis carinii* as the cause of human disease: historical perspective and magnitude of the problem: introductory remarks". *Natl Cancer Inst Monogr.* 1976;43:1-11.

14. Vanek J. "Atypicka (interstitiálni) pneumonie detí vyvolaná *Pneumocystis carinii* (atypical interstitial pneumonia of infants produced by *Pneumocystis carinii*)". *Casop lék cesk.* 1951;90:1121–4.

15. Jírovec O. "*Pneumocystis carinii* puvodce t. zv intertitialnich plasmocelularnich pneumonii kojencw (Pneumocystis carinii, the cause of interstitial plasmacellular pneumonia in neonates)". *Csl Hyg epid mikrob.* 1952;1:141.

16. Frenkel JK. "*Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview". *J Eukaryot Microbiol.* 1999;46:89S-92S.

17. Hughes WT, McNabb PC, Makres TD, Feldman S. "Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis". *Antimicrob Agents Chemother.* 1974;5:289-293.

18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). "*Pneumocystis* Pneumonia --- Los Angeles". *Morbidity and Mortality Weekly Reports (MMWR).* 1981;30(21):1-3.

19. Wachter RM, Luce JM, Turner J, Volberding P, Hopewell PC. "Intensive care of patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Outcome and changing patterns of utilization". *Am Rev Respir Dis.* 1986;134:891-896.

20. Dohn MN, Baughman RP, Vigdorth EM, Frame DL. "Equal survival rates for first, second, and third episodes of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome". *Arch Intern Med.* 1992;152:2465-2470.

21. Fischl MA, Dickinson GM, La VL. "Safety and efficacy of sulfamethoxazole and trimethoprim chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS". *JAMA.* 1988;259:1185-1189.

22. Delmas MC, Schwoebel V, Heisterkamp SH, *et al.* "Recent trends in *Pneumocystis carinii* pneumonia as AIDS-defining disease in nine European countries. Coordinators for AIDS Surveillance". *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995;9:74-80.

23. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, *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 Suppl 1:S5-14.

24. Weverling GJ, Mocroft A, Ledergerber B, *et al.* "Discontinuation of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. EuroSIDA Study Group". *Lancet.* 1999;353:1293–8.

25. Mocroft A, Katlama C, Johnson AM, *et al.* AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study". *Lancet.* 2000;356:291-296.

26. Matos O. "*Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Africa: impact and implications of highly sensitive diagnostic technologies". *N Am J Med Sci.* 2012;4:486-487.

27. Walzer PD, Evans HE, Copas AJ, *et al.* "Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006". *Clin Infect Dis.* 2008;46:625-633.

28. Smulian AG, Sullivan DW, Linke MJ, *et al.* "Geographic variation in the humoral response to *Pneumocystis carinii*". *J Infect Dis.* 1993;167:1243-1247.

29. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. UNAIDS / JC2502/1/E.

(http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf)

30. de Armas Rodríguez Y, Wissmann G, Müller AL, *et al.* "*Pneumocystis jirovecii* pneumonia in developing countries". *Parasite.* 2011;18(3):219-28.

31. Calderón EJ, de Armas Y, Panizo MM, Wissmann G. "*Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Latin America. A public health problem?" *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(6):565-70.

32. Malin AS, Gwanzura LK, Klein S. *et al.* "*Pneumocystis carinii* pneumonia in Zimbabwe". *Lancet.* 1995;346:1258-1261.

33. Worodria W, Okot-Nwang M, Yoo SD, Aisu T. "Causes of lower respiratory infection in HIV-infected Ugandan adults who are sputum AFB smear-negative". *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:117-123.

34. Armstrong W, Meshnick S, Kazanjian P. "*Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients". *Microbes Infect.* 2000;2:61-67.

35. Esteves F, Gaspar J, de Sousa B, *et al.* "*Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping in pooled DNA samples: A new approach for epidemiological and clinical studies". *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E177-E184.

36. Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, *et al.* "Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia". *Chest.* 2007;131(4):1173-80.

37. de Boer MG, Gelinck LB, van Zelst BD, *et al.* "β-D-glucan and S-adenosylmethionine serum levels for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-negative patients: a prospective study". *J Infect.* 2011;62(1):93-100.