

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS

FERNANDO ALMEIDA DA SILVA

DESEMPENHO DE MÉTODOS LABORATORIAIS
NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES FÚNGICAS
PULMONARES EM PACIENTES DO INSTITUTO
NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS

Rio de Janeiro

2015

DESEMPENHO DE MÉTODOS LABORATORIAIS
NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES FÚNGICAS
PULMONARES EM PACIENTES DO INSTITUTO
NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS

FERNANDO ALMEIDA DA SILVA

Dissertação apresentada ao
Curso de Mestrado em Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas
do Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas –
INI, como parte dos requisitos
necessários para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof^a Dr^a Rosely
Maria Zancopé Oliveira e Prof. Dr.
Mauro de Medeiros Muniz

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Fernando Almeida da

Desempenho de métodos laboratoriais no diagnóstico de infecções fúngicas pulmonares em pacientes do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / Fernando Almeida da Silva. – Rio de Janeiro, 2015.
xx,112 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2015.

Bibliografia: f. 84-99.

1. *Pneumocystis jirovecii*. 2. Imunoensaios. 3. Métodos moleculares. 4. Diagnóstico. 5. Pneumonia. 6. Fungos. I. Título.

CDD 616.24075

FERNANDO ALMEIDA DA SILVA

MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS

Dissertação apresentada ao
Curso de Mestrado em Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas
do Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas –
INI, como parte dos requisitos
necessários para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof^a Dr^a
Rosely Maria Zancopé
Oliveira e Prof. Dr. Mauro de
Medeiros Muniz

Aprovada em: / /

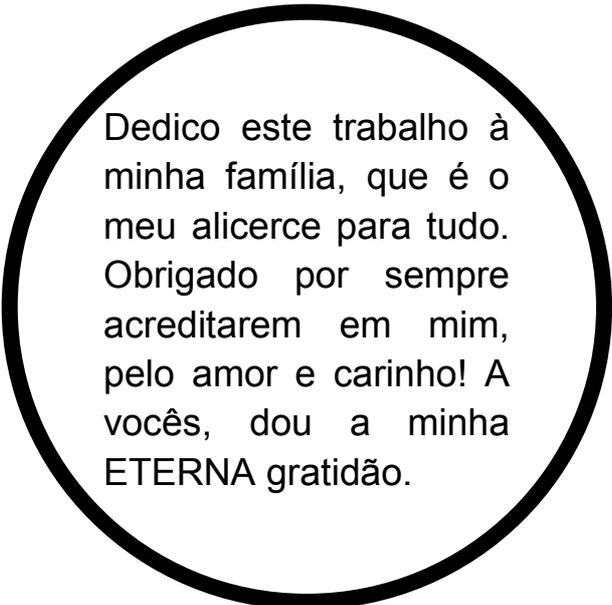
Banca Examinadora:

Dr^a. Marli Jane Martins Costa

Dr. José Mauro Peralta

Dr. Leonardo Pereira Quintella

Revisor: Dr. Rodrigo de Almeida Paes



Dedico este trabalho à
minha família, que é o
meu alicerce para tudo.
Obrigado por sempre
acreditarem em mim,
pelo amor e carinho! A
vocês, dou a minha
ETERNA gratidão.

Até que provem ao contrário, não mudo minha conduta. Para chegar até aqui foram muitos anos de luta, de dedicação, dando valor a tudo, sempre plantei boas sementes, hoje colho bons frutos. Com muito amor, sem deixar de ser quem sou, sei de onde vim, o que eu quero e aonde eu vou. Sempre serei abençoado, Deus, cubra-nos com seu manto sagrado, me aponte os caminhos, me dê sabedoria e humildade, dai-me as opções, mas seja feita a Vossa vontade. Não pense que não és capaz, nunca irá chegar na frente se você vive correndo atrás. Enfim, é um pouco da vida que eu aprendi, poucos vão te dar moral, e muitos tentam te oprimir. Fica tranquilo, que o que é seu está garantido: Deus não escolhe os capacitados, Ele capacita os escolhidos!

Vá na fé e não na sorte!

- Marcelo Melo Junior-

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que tudo criou, inclusive a mim, por ter sustentado o meu fôlego de vida até o dia de hoje, por ter me dado a capacidade intelectual que julgou necessária e por guiar a minha vida. Obrigado por ter me escolhido antes que eu Te escolhesse!

À minha família linda, que é um presente de Deus na minha vida. Para que uma obra seja concluída, é necessário que haja um bom alicerce para sustentá-la. Pois bem, aonde quer que eu chegue, vou dizer que tive uma família que foi o meu alicerce. Obrigado por tanto amor e carinho, ainda que o mundo esteja de pernas para o ar, dentro de casa é que eu encontro PAZ.

À minha orientadora, Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira, que desde a minha graduação me concedeu oportunidades profissionais, que tem cuidado com seus alunos, que é uma mãezona, dando um puxão de orelha na hora certa, mas também dando carinho quando necessário. Obrigado pela imensa oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e da sua vida profissional, por me fazer crescer profissionalmente e pelas oportunidades concedidas!

Ao meu co-orientador, Dr. Mauro de Medeiros Muniz que também desde a iniciação científica vem me acompanhando e compartilhando seu conhecimento comigo. Obrigado pelas palavras encorajadoras, pelo profissionalismo, pela parceria, pela confiança e por ter aceitado se tornar um grande amigo meu! Quando eu “crescer”, quero ser igual a você.

Ao meu revisor Dr. Rodrigo de Almeida Paes que dedicou tempo na revisão do presente documento, fazendo brilhantes observações e conseqüentemente contribuindo bastante para a melhoria do mesmo, muitas vezes o trabalho do revisor não é citado, mas fica aqui o meu agradecimento pela grande contribuição.

Ao Dr. Leonardo Pereira Quintella, que com grande conhecimento me ajudou em todas as leituras das técnicas de coloração pela Prata e Hematoxilina & Eosina, por ter aceitado ser o Professor convidado nos meus seminários, compartilhando comigo o seu conhecimento, seu tempo e seu bom humor.

À banca avaliadora, que aceitou participar avaliando o presente trabalho e fornecendo suas contribuições, Dr. Leonardo Pereira Quintella, Dr^a Marli Jane Martins Costa e o Dr. José Mauro Peralta.

Ao grupo do laboratório de Micologia do INI – Setor Imunodiagnóstico, cada um com sua parcela de contribuição, sei que todos torceram e vibraram quando fui aprovado no Mestrado e hoje não poderia deixar de agradecer pela amizade e ajuda para que esse trabalho pudesse ser realizado, Dr^a Claudia Vera Pizzini, Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira, Prof. Marcos de Abreu Almeida, Dr. Leonardo Silva Barbedo, Victor Fernandes Tatagiba, Luã Cardoso de Oliveira, Gabriela Cortes Tecla, Vanessa Brito e Gabriela Costa Maia Pinto.

Ao Grupo do Laboratório de Micologia - Setor Diagnóstico Micológico, por também serem meus amigos e estarem sempre me dando apoio, Dr. Rodrigo de Almeida Paes, Prof^a. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho, Prof^o Fábio Brito dos Santos, Evelyn Campos da Silva.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do INI, liderado pela Dr^a Janice Mery Chicarino de Oliveira Coelho por me receber tão bem no laboratório e à toda equipe que me ajudou na realização das técnicas de Hematoxilina&Eosina, Coloração pela Prata metanamina e Imunohistoquímica, Dr^a Patrícia Pereira Fonseca, Luiz Claudio Ferreira, Marco Lucas, Antônio Carlos da Silva, Francisco das Chagas Carvalho Rodrigues, Ingrid Paiva, Dulce Maria Portugal.

Ao serviço de Anatomia Patológica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por ceder o espaço e o equipamento necessários para uma leitura mais dinâmica das lâminas.

Ao grupo de pesquisa espanhol, coordenado pela Dr^a Maria Jose Buitrago, que aceitou cooperar com o presente estudo, realizando a qPCR Multiplex e nos concedendo os respectivos resultados.

Ao serviço de Micologia Médica e Experimental da Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) – Medellín, Colômbia, em especial a Dr^a Angela Restrepo, Dr^a Beatriz Lucia Gomez, Prof^o Cesar Orlando Muñoz Cadavid e a Luiza Fernanda Lopez, que me concederam um estágio e me ajudaram a padronizar a *nested* PCR para *Pneumocystis jirovecii* utilizada nesse estudo.

À Edwiges Motta dos Santos que dedicou seu tempo ajudando na classificação dos pacientes. Obrigado pelo tempo investido, pela troca de informações, pela parceria e pela amiga que se tornou!

À Carla Oliveira Ribeiro, pela incansável força de vontade em ajudar, pelas dicas a respeito do trabalho, por ter sempre uma boa palavra, por demonstrar carinho e vontade que as coisas dessem certo. Você é sensacional, uma amiga e tanto... Anjos existem!

À Lisandra Serra Damasceno que dedicou seu tempo ajudando na classificação dos pacientes, aceitando cooperar, mesmo que em cima da hora não se opôs, Muito obrigado pela ajuda!

Ao serviço de importação e exportação da Fiocruz, mais especificamente à Lívia Vitória, por nos conceder todo o suporte necessário para o envio das amostras biológicas à Espanha.

À Plataforma de Apoio à Pesquisa do INI, em especial ao Marcel de Souza Borges Quintana e à Vania Reis Girianelli pela especial ajuda e atenção para análise de alguns dados do presente trabalho

Aos professores do curso de Pós-graduação do INI que nos ensinam, nos cobram, mas tudo com o propósito de nos fazer crescer profissionalmente, se não fosse assim, não haveria crescimento.

À Fundação Oswaldo Cruz, por me conceder a bolsa de estudos e ao INI pelo espaço físico e infraestrutura necessários para a realização do estudo.

Aos pacientes que aceitaram participar do estudo, nos proporcionando analisar suas amostras biológicas, se tornando assim, partes fundamentais do trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADOMET – ADENOSYLMETHIONINE

BHQ – BLACK HOLE QUENCHER

CYTED – PROGRAMA IBERO-AMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA EL DESAROLLO (PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA O DESENVOLVIMENTO)

DDS – DAPSONA

DHFR – DIHIDROFOLATE REDUTASE

DHPS – DIHIDROPTEROATE SINTASE

DIP's – DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO

DTT – DITIOTREITOL

EDTA - ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID (ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO)

EE – ESCARRO ESPONTÂNEO

EI – ESCARRO INDUZIDO

FITC - FLUORESCEIN ISOTHIOCYANATE (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA)

INI – INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA

ITS – *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO)

IV – INTRAVENOSA

LBA - LAVADO BRONCOALVEOLAR

MSG – GLICOPROTEÍNA PRINCIPAL DE SUPERFÍCIE

mtLSUrRNA – SUBUNIDADE MAIOR DO RNA RIBOSSOMAL MITOCONDRIAL

PABA – ÁCIDO PARAAMINOBENZÓICO

PCP – PNEUMONIA POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

PFGE – PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO)

RFLP – RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLIMORPHISM
(FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS GERADOS POR ENZIMAS DE
RESTRICÇÃO)

RNA – ÁCIDO RIBONUCLÉICO

rRNA – ÁCIDO RIBONUCLÉICO RIBOSSOMAL

RPM – ROTAÇÕES POR MINUTO

SMX - SULFAMETOXAZOL

TMP – TRIMETROPRIM

SSCP – SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHISM
(POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE FITA SIMPLES)

TARV – TERAPIA ANTIRETROVIRAL

TEM – TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE (MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO)

TS – TIMIDILATO SINTETASE

TTO - TRATAMENTO

VO – VIA ORAL

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION / OMS - ORGANIZAÇÃO
MUNDIAL DA SAÚDE

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	21
1.1 - HISTÓRICO.....	22
1.2 - CLASSIFICAÇÃO.....	23
1.3 – IMPORTÂNCIA CLÍNICA E EPIDEMIOLOGIA.....	27
1.4 - TRANSMISSÃO.....	29
1.5 – CICLO DE VIDA, MORFOLOGIA E PATOGENIA.....	31
1.6 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	35
2 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	36
2.1 – DETECÇÃO POR TÉCNICAS DE COLORAÇÃO.....	36
2.2 – DETECÇÃO POR IMUNOENSAIOS.....	38
2.3 – DETECÇÃO MOLECULAR.....	39
2.4 – DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PNEUMONIAS FÚNGICAS.....	41
3 - TRATAMENTO	44
4 - JUSTIFICATIVA	47
5 -OBJETIVO	49
5.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
6 - METODOLOGIA	50
6.1 – DESENHO DO ESTUDO.....	50
6.2 – CASUÍSTICA.....	50
6.3 – REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	51
6.4 – TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA.....	51
6.5 – COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA & EOSINA.....	52
6.6 – IMPREGNAÇÃO PELA PRATA.....	53
6.7 – REAÇÃO DE CALCOFLUOR.....	53
6.8 – CULTURA.....	53
6.9 – EXTRAÇÃO DE DNA.....	54
6.10 – PCR PARA β GLOBINA.....	54
6.11 – NESTED PCR PARA <i>P. jirovecii</i> e <i>H. capsulatum</i>	54
6.12 – qPCR MULTIPLEX.....	57
6.13 – CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL.....	58
6.14 – ASPECTOS ÉTICOS.....	59

7- RESULTADOS	60
7.1 – IMUNOENSAIOS.....	63
7.2 – TESTES DE COLORAÇÃO.....	64
7.3 – MÉTODOS MOLECULARES.....	66
7.4 – CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS LABORATORIAIS.....	71
7.5 – CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL.....	73
8- DISCUSSÃO	76
9- CONCLUSÕES.....	82
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICES	100
ANEXOS	106

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** *Primers* utilizados na amplificação de sequência do gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii* por *nested* PCR e *primers* utilizados para amplificação de sequência do gene humano da β -globina por PCR convencional..... 55
- Tabela 2:** Condições de ciclos térmicos aplicados à *nested* PCR para o gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii* e PCR para o gene da β -globina humano..... 56

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Sequências dos *primers* e sondas utilizadas na qPCR multiplex... 57
- Quadro 2:** Características clínico-sociais dos pacientes incluídos no estudo.
..... 61
- Quadro 3:** Sistema de pontuação segundo Smith, Forbes & Gazzard (1992) e validade em predizer PCP em 40 pacientes incluídos no estudo..... 62
- Quadro 4:** Probabilidade de PCP de acordo com *score* final..... 62
- Quadro 5:** Distribuição dos resultados do teste de Imunofluorescência entre os pacientes que tiveram resultado positivo e negativo em seus respectivos scores
.....74
- Quadro 6:** Distribuição dos resultados da *nested* PCR entre os pacientes que tiveram resultado positivo e negativo em seus respectivos scores..... 75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema representativo do ciclo de vida (fase sexuada e assexuada) de *Pneumocystis*..... 34
- Figura 2:** Variação de manifestações clínicas da pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* dependendo do status imunológico do hospedeiro..... 35
- Figura 3:** Mecanismo de ação da combinação das drogas Sulfametoxazol e Trimetopim inibindo as enzimas DHPS e DHFR..... 45
- Figura 4:** Representativo das amostras positivas para *P. jirovecii* na reação de imunofluorescência direta..... 63
- Figura 5:** Demonstrativo dos espécimes clínicos submetidos à imunocitoquímica..... 64
- Figura 6:** Representativo da avaliação da coloração por Hematoxilina & Eosina.65
- Figura 7:** Amostra apresentando estruturas leveduriformes na coloração pela prata metanamina compatíveis com *H. capsulatum*.....66
- Figura 8 –** Reação *nested* PCR utilizando *primers* de *P. jirovecii* contra DNA de outros fungos, 1-*Candida glabrata*, 2-*Cryptococcus neoformans*, 3-*Paracoccidioides brasiliensis*, 4- *Sporothrix schenckii*, 5-*Pneumocystis jirovecii*, 6-*Histoplasma capsulatum* e 7-Controle negativo..... 67
- Figura 9 –** Padrão de bandas após eletroforese em gel de agarose a 1% de amostras analisadas para *P. jirovecii* pela *nested* PCR, sendo as amostras 2, 5, 8, 11 positivas; amostra 12 – Controle positivo e amostra 14 – Controle negativo..... 68

Figura 10 - Reação de amplificação com *primers* para *H. capsulatum* contra DNA de outros fungos. PM – Peso molecular, 1 – *Candida glabrata*, 2 – *Cryptococcus neoformans*, 3 – *Paracoccidioides brasiliensis*, 4 – *Pneumocystis jirovecii*, 5 – *Sporothrix schenckii*, 6 – *Histoplasma capsulatum* e 7 – Controle negativo..... 69

Figura 11– Padrão de bandas positivas para *H. capsulatum* em gel de agarose a 1% após eletroforese, sendo, da amostra 2 a 11 positivas, 12 – Controle negativo e 13 – Controle positivo..... 70

Figura 12 – Reação de *nested* PCR com *primers* de *H. capsulatum* utilizados com DNA extraídos de amostras positivas em cultura. PM – peso molecular, 1 – Controle negativo, 2 ao 6 – amostras positivas em cultura e positivas na PCR e 7= controle positivo..... 71

Figura 13 - Detecção de positividade por meio da IFD e *nested* PCR entre os pacientes com variadas probabilidades de PCP..... 74

LISTA DE APÊNDICE E ANEXOS

Apêndice 1: Correlação dos espécimes clínicos, com os resultados obtidos e suas respectivas contagens de CD4, carga viral e tratamento.

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Anexo 2: Termo de Compromisso.

Almeida-Silva, F. **Desempenho de Métodos Laboratoriais no diagnóstico de infecções fúngicas pulmonares em pacientes do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas**. Rio de Janeiro, 2015.109f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Infecções pulmonares são geralmente comuns em hospedeiros imunocomprometidos. Entre as infecções pulmonares, pneumocistose, histoplasmose e criptococose são as mais importantes infecções fúngicas na população imunocomprometida, especialmente quando a contagem de células TCD4+ está abaixo de 200 células/m³. Pneumonias fúngicas podem ser fulminantes e o diagnóstico dessas infecções pode ser difícil. O diagnóstico definitivo necessita de evidências microbiológicas ou histopatológicas, mas em alguns fungos, a cultura é demorada e pode levar de 2 a 4 semanas para se obter um resultado positivo, atrasando a decisão clínica. No diagnóstico convencional, baseado no exame direto, cultura, histopatologia ou imunocitoquímica, estes fungos são frequentemente confundidos com outros microrganismos e o diagnóstico diferencial é necessário. Métodos moleculares podem oferecer uma contribuição muito importante para o diagnóstico porque os resultados são rápidos. O objetivo principal desse trabalho foi comparar o rendimento de métodos convencionais e métodos moleculares para diagnóstico, como cultura, imunofluorescência direta, imunocitoquímica, calcofluor, Grocott e nested PCR para detectar sequência parcial específica de *Histoplasma capsulatum* e *Pneumocystis jirovecii* e qPCR Multiplex para detectar simultaneamente sequências de *P. jirovecii*, *H. capsulatum* e *Cryptococcus neoformans*. Foram analisadas 40 amostras respiratórias de indivíduos imunocomprometidos, como escarro induzido ($n = 22$), lavado traqueal ($n = 10$), lavado broncoalveolar ($n = 5$) e escarro espontâneo ($n = 3$). Comparando os resultados obtidos por essas diferentes metodologias, os métodos convencionais não se mostraram satisfatórios, não apresentando resultados positivos no calcofluor e na imunocitoquímica, somente dois resultados positivos para *C. neoformans* na cultura, duas amostras positivas para *H. capsulatum* na coloração pelo Grocott e seis amostras positivas para *P. jirovecii* na imunofluorescência direta. Utilizando a metodologia molecular qPCR multiplex, duas amostras foram positivas para *C. neoformans*, uma positiva para *P. jirovecii* e 11 para *H. capsulatum*. A nested PCR mostrou o melhor desempenho, detectando 12 amostras positivas para *P. jirovecii* e 28 positivas para *H. capsulatum* e demonstrou nove casos clínicos de coinfeção por esses fungos mostrando a importância do uso de diversas ferramentas diagnósticas para investigar a presença de possíveis agentes fúngicos. Os resultados do presente estudo foram similares aos descritos na literatura. A nested PCR foi o melhor método para detectar *P. jirovecii* nas amostras respiratórias e uma boa ferramenta para detectar *H. capsulatum* em espécimes clínicos humanos, assim como, apresentou alta sensibilidade quando comparada com métodos tradicionais.

Palavras-Chave: 1. *Pneumocystis jirovecii*. 2. Imunoensaios. 3. Métodos Moleculares. 4. Diagnóstico. 5. Pneumonia. 6. Fungos

Almeida-Silva, F. **Performance of laboratorial methods in the diagnosis of mycotic pulmonary infections in patients of the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas**. Rio de Janeiro, 2015. 109p. Master [Science dissertation in clinical research in Infectious diseases] – Infectology National Institute Evandro Chagas.

ABSTRACT

Pulmonary infections are usually common in immunocompromised hosts. Among the pulmonary infections, pneumocystosis, histoplasmosis, and cryptococcosis are the most important fungal infections in the immunocompromised population, especially when the TCD4⁺ cells count are below 200 cells/m³. Fungal pneumonia can be fulminant and the diagnosis of these infections can be difficult. Definitive diagnosis requires histopathological or microbiological evidences, but in some fungi, the culture is time consuming and can take up to 2-4 weeks to yield a positive result, delaying the clinical decisions. In the conventional diagnosis, based on direct examination, culture, histopathology, or immunocytochemistry these fungi are frequently mislead with other microorganisms and the differential diagnosis is necessary. Molecular methods can offer a very important contribution to diagnosis because the results are faster. The main objective of this work was to compare the performance of conventional and molecular diagnostic methods, such as culture, direct immunofluorescence, immunocytochemistry, Calcofluor, Grocott, and nested PCR to detect partial specific sequence of *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis jirovecii* and qPCR Multiplex to detect simultaneously sequences of *P. jirovecii*, *H. capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. We analyzed 40 respiratory samples of immunocompromised individuals, such as induced sputum ($n = 22$), tracheal wash ($n = 10$), bronchoalveolar lavage ($n = 5$), and spontaneous sputum ($n = 3$). Comparing the results obtained by these different methodologies, the conventional methods were not satisfactory, yielding no positive results in calcofluor and immunocytochemistry, just two positive results for *C. neoformans* in culture, two samples positive for *H. capsulatum* in the Grocott staining, and six positive samples to *P. jirovecii* in direct immunofluorescence. Using the qPCR multiplex molecular methodology two samples was positive to *C. neoformans*, one positive to *P. jirovecii* and 11 positive to *H. capsulatum*. The nested PCR has shown the best performance detecting 12 samples positive for *P. jirovecii* and 28 positive for *H. capsulatum* and demonstrated nine clinical cases of co-infection with these fungi, showing the importance of using several diagnostic tools to investigate the presence of possible fungal agents. The results of the present study were similar to the described in the literature. The nested PCR has been the best method to detect of *P. jirovecii* in respiratory samples and a good tool to detect *H. capsulatum* in human clinical specimens as well, presenting higher sensitivity when compared with traditional diagnostic tests.

Keywords: 1. *Pneumocystis jirovecii*. 2. Immunoassays. 3. Molecular Methods. 4. Diagnosis. 5. Pneumonia. 6. Fungi

1 - INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas e parasitárias (DIP) estão entre os agravos que afligem as populações humanas com maior frequência, e que são relacionados às taxas elevadas de mortalidade (Global Health Council, 2011).

As DIP's permanecem como a principal razão para a utilização dos serviços de saúde, envolvendo custos elevados com tratamentos e internações, assim como custos sociais relacionados à ausência a escola, ao trabalho e aposentadorias precoces além do risco constante de surtos epidêmicos e da emergência ou re-emergência de DIP's. Uma considerável parcela de morbidade/mortalidade associada poderia ser evitada por medidas de prevenção ou de tratamento adequado. No entanto, para que tais medidas sejam delineadas, é necessário que métodos rápidos e precisos de diagnóstico sejam desenvolvidos e aplicados. Além disso, devido às características de potencial disseminação rápida e global de muitos dos agentes de DIP's, o desenvolvimento de estratégias que permitam a sua rápida detecção e o seu controle torna-se prioritário. Portanto, métodos diagnósticos que combinem precisão e rapidez, e se possível, custos moderados, se fazem necessários. Para tal, os métodos moleculares podem oferecer importantes contribuições (Peralta, comunicação pessoal).

As infecções fúngicas contribuem com uma parcela substancial das DIP's, sendo muitas vezes acompanhadas de prognóstico grave, associadas às altas taxas de letalidade ou sequelas. As micoses que acometem o trato respiratório continuam sendo importantes problemas de saúde pública no Brasil, com elevada taxa de comprometimento populacional (PRADO *et al*, 2009). Dentre estas, a pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* tem se destacado, devido à baixa imunidade, característica da população portadora de aids.

1.1 - HISTÓRICO

O agente que é denominado atualmente na comunidade científica como *Pneumocystis jirovecii* foi descrito pela primeira vez em 1909 pelo brasileiro Carlos Chagas, durante a observação da morfologia dos cistos presentes em cobaias com tripanossomíase experimental acreditando estar perante uma nova forma de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909).

Um ano mais tarde (1910), Antonio Carini, analisando biópsias de pulmão de ratos infectados com *T. cruzi*, observou formas císticas idênticas às que haviam sido descritas por Chagas, confirmando assim, a descoberta deste (CARINI, 1910). Apesar de acreditar igualmente que estava perante estruturas do mesmo protozoário, não excluiu a hipótese de que os cistos observados pudessem pertencer a um organismo desconhecido e enviou amostras para o Instituto Pasteur em Paris. Em 1912, Pierre e Marie Delanoe classificaram *Pneumocystis* como uma nova espécie e concluíram que não se tratava de um *Trypanosoma*, mas sim de um novo protozoário (DELANOE & DELANOE, 1912), passando a designá-lo por *Pneumocystis carinii*, denominação acolhida devido ao seu tropismo para o pulmão (*Pneumocystis*) e como forma de homenagem ao investigador ítalo-brasileiro.

Mais tarde, em 1942, Van Der Meer e Brug (1942) observaram, pela primeira vez, que o microrganismo atingia também o homem. Esta descoberta, porém, manteve-se relativamente desconhecida, até que, no início da década de 50, Vanek e Jirovec na Checoslováquia e na Alemanha, verificaram que certas pneumonias intersticiais, que surgiam como surtos em crianças desnutridas e em pacientes atingidos por infecções hospitalares eram causadas por *P. carinii*, assim demonstrando que o microrganismo, ao contrário do que se pensava, não só infectava animais, como também humanos (JIROVEC, 1952; VANEK, 1951).

1.2 – CLASSIFICAÇÃO

A classificação de *P. carinii* como um protozoário manteve-se até os anos 80, devido às similaridades entre a morfologia do microrganismo (formas císticas grandes com 2 a 8 núcleos) e a patologia observada no hospedeiro. Com ausência de algumas características fenotípicas características dos fungos, bem como pela não resposta às drogas antifúngicas contra o agente e pela efetividade de drogas como sulfonamidas e trimetoprim, geralmente usadas no tratamento de protozoários.

Em 1988, surgiram os primeiros estudos voltados aos ácidos nucleicos que fizeram cair por terra a teoria de que *P. carinii* seria um protozoário. Estudos tendo como base a sequência do gene 16S do RNA ribossomal de *Pneumocystis* presente em ratos, mostraram que esta sequência apresentava grande similaridade com sequências genômicas de outros fungos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* e *Cryptococcus neoformans* e não com o gene 18S rRNA característico dos protozoários, sendo *P. carinii* reclassificado e remanejado para o Reino *Fungi* (EDMAN *et al.*, 1988; STRINGER *et al.*, 1989; STRINGER, 1996).

Com o início das análises de sequências de DNA, surgiram as informações necessárias para esclarecer o assunto e estabelecer a efetiva existência de diferenças fenotípicas entre diferentes espécies de *Pneumocystis*. Para tal, foi fundamental a utilização de um método de reação em cadeia da polimerase (PCR), realizada por Wakefield, que desenvolveu *primers* para amplificar sequências de DNA de *Pneumocystis*. A partir daí, mediante o sequenciamento do gene que codifica a subunidade maior do RNA ribossomal mitocondrial (mtLSUrRNA), foi possível verificar que o DNA de *Pneumocystis* presente no homem era diferente do DNA de *Pneumocystis* dos demais mamíferos (WAKEFIELD, 1990).

Posteriormente, diversos estudos foram desenvolvidos e aprofundados em diferentes laboratórios, sendo provado, a partir de exames efetuados em dezoito primatas de espécies diferentes, que a variabilidade entre os genes que codificam a mtLSUrRNA dentro das espécies de *Pneumocystis* oscilavam percentualmente entre 2 e 28% (DEMANCHE *et al.*, 2001).

Por outro lado, concluiu-se que o gene que codifica mtLSUrRNA difere cerca de 10% entre *Pneumocystis* que infecta primatas e alguns ratos, sendo que *Pneumocystis* isolado de humanos e dos ratos divergem 4% geneticamente. Estas variações são significativamente diferentes daquelas que se verificam em outros fungos, como observado em *Saccharomyces*, onde a diferença não excede 1%, e que as variações que se observam entre *Candida albicans* e *Candida tropicalis* se situam em 1,6% (STRINGER *et al.*, 1989).

Face à heterogeneidade do gênero *Pneumocystis*, bem como à sua especificidade em relação a cada hospedeiro, no 3º Workshop Internacional sobre *Pneumocystis*, houve consenso entre os pesquisadores quanto à introdução na nomenclatura de *Pneumocystis carinii* da designação “f. sp.” (do latim, *formae specialis*) (ANONYMOUS, 1994), passando-se então, em termos de nomenclatura científica, a distinguir entre as formas do agente que se manifestam em humanos (*Pneumocystis carinii f. sp. hominis*) e nas diversas espécies de animais: *Pneumocystis carinii f. sp. carinii* (ratos), *Pneumocystis carinii f. sp. suis* (porco), *Pneumocystis carinii f. sp. equis* (cavalo), e assim por diante.

Na sequência destas evoluções e de estudos mostrando que as sequências genéticas de *Pneumocystis* eram diferentes em função das espécies de mamíferos infectados, viria a ser acolhida, em 1999, uma nova designação para *Pneumocystis* que afetam os humanos (FRENKEL, 1999) passando o mesmo a ser designado em homenagem ao parasitologista Tcheco Otto Jirovec, um dos pioneiros na descrição desta infecção em humanos.

Esta mudança de designação foi polêmica, pois, além de se observar que a alteração era desnecessária e, até desaconselhável, por ser suscetível a criar confusões no meio da medicina clínica, argumentava-se que Jirovec não havia sido o primeiro pesquisador a descobrir *P. carinii* em seres humanos e que, devendo por princípio a nomenclatura de um grupo taxonômico basear-se na prioridade da publicação (HUGHES, 2003).

De todo modo, considerou-se vantajoso abandonar a nomenclatura trinomial anterior e adotar uma designação binominal, conforme as novas linhas de orientação que propunham que cada espécie fosse definida em

função da linha que advém dos seus ascendentes populacionais, mantendo-se a sua identidade em relação aos outros grupos (WILEY, 1978).

A nova nomenclatura, *P. jirovecii*, foi sendo consolidada na comunidade científica (Stringer *et al.*, 2002), tendo sido acolhida definitivamente a partir de 2005, no *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN) *P. jirovecii* (READHEAD *et al.*, 2006), distinguindo-se das demais designações que foram formalmente acolhidas para o *Pneumocystis* de outras espécies, por exemplo, *P. carinii* e *P. wakefieldiae* (que ficou reservado para os ratos), *P. murina* (para camundongos) e *P. oryctolagi* (para os coelhos).

Devido à homologia do RNA ribossomal (rRNA) de *P. jirovecii* com sequências de ácidos nucleicos idênticas às de alguns fungos, este microrganismo continua pertencendo ao Reino *Fungi*. Todavia, a sua classificação nunca deixou de motivar bastante discussão (CURRY *et al.*, 1991). Na verdade, *P. jirovecii* quando comparado com outros fungos patogênicos para o homem, ou mesmo com outros modelos de fungos, possui algumas características atípicas, já que é um microrganismo que até o presente momento não é cultivável em meios microbiológicos que não contenham cultura de células, fato cuja explicação ainda é desconhecida.

Por outro lado, possui apenas uma cópia do RNA ribossomal nuclear, apresenta uma parede celular pobre em ergosterol e rica em colesterol (FLORIN *et al.*, 1994; KANESHIRON *et al.*, 1994), o que faz com que seja resistente aos antifúngicos clássicos (como anfotericina B e azólicos). Outra característica fora do comum está no fato de *P. jirovecii* possuir na sua forma vegetativa assexuada, uma parede celular frágil e flexível, contendo 1-3 β glucano e glicoproteínas, o que se mostra importante para a sua viabilidade (WALZER 2004).

Outra característica que também merece atenção, é o fato de *P. jirovecii* não possuir mais de duas cópias do gene que codifica 18S rRNA, ao contrário de outros fungos que possuem centenas de cópias deste gene (GIUNTOLI *et al.*, 1994).

Devido às peculiaridades fenotípicas e genotípicas de *P. jirovecii* em relação a outros fungos, Eriksson chegou a propor colocar esta espécie em nova família taxonômica chamada *Pneumocystistidaceae*, classe *Ascomycota* e

uma nova ordem, *Pneumocystidales* (Erikson, 1994). Mais tarde, coincidentemente com a bifurcação das linhas *Basidiomycete* e *Ascomycete*, foi também proposta no reino dos fungos uma nova ramificação com a designação de *Pneumocystis species*, *Pneumocystis jirovecii*.

A comunidade científica nunca deixou de classificar *P. jirovecii* como um fungo colocando-o no grupo de fungos chamados *Archiascomycetes*, ainda integrado na linha dos *Ascomycetes* (JANNIK-HELWEG-LARSEN, 2004), amparados nos estudos genéticos que, com base em comparações de regiões conservadas de sequências do gene mitocondrial (subunidades maior e menor do rRNA), dos genes codificadores da timidilato sintetase (TS), da redutase dihidrofolato (DHFR), da tubulina e da actina mostram grande similaridade com os fungos (EDMAN *et al.*, 1988; PIXLEY *et al.*, 1991), e também no fato de o fator de alongamento III (YPMA-WONG *et al.*, 1992), proteína única nos fungos, estar presente no microrganismo, e a classificação taxonômica proposta por HIBBETT e colaboradores (2007), encontra-se resumida da seguinte forma:

Domínio Eukarya

Reino *Fungi*

Sub-reino Dykaria

Filo *Ascomycota*

Sub-filo *Taphrinomicotyna sensu*

Classe *Pneumocystidomycetes*,

Ordem *Pneumocystidales*,

Família *Pneumocystidaceae*.

Gênero *Pneumocystis*

Espécie *jirovecii* (humano), *carinii*, *murina*, *wakefieldiae* (ratos) e *oryctolagi* (coelho)

1.3 - IMPORTÂNCIA CLÍNICA E EPIDEMIOLOGIA

P. jirovecii é um microrganismo eucarioto oportunista, que se encontra distribuído mundialmente, estando descrito em todos os continentes (com exceção da Antártida). Hoje em dia, sabe-se que o mesmo é responsável por pneumonias severas e até fatais, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Todavia, desde a sua descoberta até à década de 1940, nunca lhe foi atribuída ou reconhecida especial importância clínica.

Ao longo dos anos 60 e 70, a importância dada ao microrganismo e à infecção causada por ele foi crescendo, e o microrganismo passou a ser reconhecido como um dos principais agentes patogênicos oportunistas do pulmão. Apresentando capacidade para desencadear graves pneumonias, quer em crianças com sistemas imunológicos enfraquecidos, quer em adultos com imunodeficiências congênicas e, muito especialmente, em pacientes sujeitos a terapias de natureza imunossupressora, como acontecia com os pacientes oncológicos e submetidos a transplantes de órgãos, a quem são administrados fármacos de ação citotóxica.

Nessa ocasião, as taxas de pneumonia por *Pneumocystis* (PCP) oscilavam entre 5% e 25% nos doentes sujeitos a transplante, entre 2% e 6% nos doentes com enfermidades vasculares e entre 1% e 25% nos doentes com câncer (MORRIS *et al.*, 2004).

No início da década de 1980, a importância clínica de *P. jirovecii* aumentou de forma exponencial, devido ao aparecimento da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), curiosamente descoberta depois de alguns investigadores, se empenharem em perceber porque motivo alguns grupos de jovens de Nova Iorque e da Califórnia estavam com PCP sem se apresentarem com qualquer das causas de imunossupressão que até ali eram conhecidas (ROSEN, 1994).

Foi então evidenciado que *P. jirovecii* apresentava-se como o principal agente de infecção e mortalidade entre a população portadora de aids. Numa fase inicial, cerca de 90% dos doentes com esta doença desenvolveram PCP e, mesmo depois desse primeiro impacto, foram feitos estudos que apontavam

que, durante a sua vida, cerca de 2/3 dos doentes infectados com HIV desenvolveriam PCP (HAY *et al.*, 1988).

Como a PCP passou a constituir, muitas vezes, a primeira infecção oportunista diagnosticada nos pacientes com aids e, ao mesmo tempo, a associar-se, com frequência, a episódios terminais da doença, foi introduzida em grande escala a profilaxia medicamentosa correspondente, o que se refletiu na primeira baixa substancial da incidência de PCP nos pacientes com aids.

No mundo, a tuberculose pulmonar ainda permanece como a principal infecção oportunista em pacientes com HIV. Embora, as micoses sistêmicas sejam diagnosticadas mais frequentemente, principalmente em indivíduos com estágio avançado de imunocomprometimento (BROWN GD, 2012; PARK BJ, 2009).

É estimado que o diagnóstico tardio de infecção por HIV pode ocorrer em até 60% dos pacientes (ALTHOFF KN, 2010). No Brasil, apesar das políticas de saúde pública terem registrado o aumento do acesso da população a testes sorológicos e a terapias antirretrovirais, com notável impacto na mortalidade, estimando que aproximadamente 40.000 novos casos de AIDS possam ocorrer anualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Portanto, o diagnóstico tardio ainda é uma realidade, favorecendo assim a identificação de AIDS somente em estágios avançados (GRANGEIRO A, 2011).

Estima-se que somente a meningite criptocócica afeta quase um milhão de pessoa com HIV/AIDS com aproximadamente 650.000 mortes por ano (PARK BJ, 2009). Pneumocistose e Histoplasmose afetam mais de 300.000 pessoas com HIV/AIDS anualmente (BROWN GD, 2012; BROWN GD *et al.*, 2014). No Brasil, as micoses sistêmicas não são doenças de vigilância epidemiológica e as reais taxas de incidência e prevalência dessas doenças são desconhecidas, no entanto, as principais infecções fúngicas associadas com a mortalidade de AIDS, são: criptococose, candidíase e histoplasmose (PRADO M, 2009).

Atualmente a PCP, além de ser descrita como uma das principais infecções oportunistas em pacientes com HIV, também vem sendo descrita em indivíduos portadores de outros tipos de Imunocomprometimento, como em

pacientes imunodeprimidos portadores de outras doenças como linfoma não-Hodgkin (KUROKAWA 2010) e também em indivíduos imunossuprimidos, como pacientes transplantados (RAMALHO. 2014).

1.4 – TRANSMISSÃO

Historicamente, acreditou-se que a infecção por *Pneumocystis* era adquirida na infância e que a PCP ocorreria via reativação de uma infecção latente quando o sistema imune do hospedeiro fosse comprometido (MORRIS & NORRIS, 2012). Diversas evidências suportam esta ideia: as características de *Pneumocystis*, uma alta soroprevalência de anticorpos anti- *Pneumocystis* na população, uma taxa elevada de PCP em crianças imunodeficientes e a detecção de *Pneumocystis* em hospedeiros hígidos.

Entre as características que sugerem que *Pneumocystis* é carregado por longo tempo no hospedeiro, a variada composição de glicoproteínas de parede indica que este fungo mantém um mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, favorecendo seu prolongado parasitismo (GIGLIOTTI, 1992).

A especificidade de *Pneumocystis* por um hospedeiro mamífero particular (GIGLIOTTI *et al.*, 1993), e a incapacidade de ser cultivado em meios de cultura não-celulares, também sugerem que este fungo requer um ambiente muito específico, como uma cultura de célula específica e não meios de cultura tradicionais (SCHILDGEN, 2014).

Estudos demonstram que possivelmente a maioria dos indivíduos possam ser expostos a *Pneumocystis* produzindo anticorpos contra o organismo ainda na fase inicial de sua vida. Estudo desenvolvido em crianças saudáveis demonstrou a presença de anticorpos anti-*Pneumocystis* em crianças que possuíam a partir de sete meses de idade, sendo que 63% dessas crianças permaneceu com títulos de 1:16 até os quatro anos de idade (PIFER *et al.*, 1978).

Outros estudos demonstraram prevalência entre 70%-100% de anticorpos em crianças saudáveis, e 70% em crianças HIV positivas e em

indivíduos adultos não infectados pelo HIV (PEGLOW *et al.*, 1990; WAKEFIELD *et al.*, 1990 *apud* MORRIS & NORRIS, 2012).

Recentemente tem sido reconhecida que a exposição proveniente do meio ambiente, e que o meio de transmissão deste fungo pudesse ser proveniente de indivíduos com PCP ou colonizados com *Pneumocystis* (MORRIS & NORRIS, 2012). Entretanto, também tem sido sugerido que possa haver reservatórios ambientais de *Pneumocystis* (CASANOVA-CARDIEL, 1997) e que fatores geográficos e climáticos possam afetar o risco de contaminação por *Pneumocystis* (OLSSON *et al* 1998).

O microrganismo nunca foi encontrado no meio ambiente, porém já foi registrada a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *P. jirovecii* em amostras de água, ar e solo, bom indício para se definir o habitat deste microrganismo (CASANOVA-CARDIAL & LEIBOWITZ, 1997; WAKEFIELD, 1994).

Posteriormente, outro estudo demonstrou que pacientes com PCP apresentavam em suas histórias clínicas, recentes atividades de jardinagem, acampamento e montanhismo, sugerindo que a exposição ao solo poderia ser uma importante fonte de infecção (NAVIN *et al.*, 2000).

PCP também está associada a diferentes regiões de uma cidade, e diversos estudos têm mostrado que diferentes genótipos de *Pneumocystis* variam em diferentes cidades e países (LEE *et al.*, 1996).

A transmissão de *Pneumocystis* tem sido bem documentada em animais, tanto imunocompetentes como imunodeprimidos, sugerindo fortemente que possa ocorrer uma transmissão entre indivíduos (MORRIS & NORRIS, 2012). Em uma série de experimentos foram demonstrados que camundongos imunocompetentes expostos a camundongos com PCP desenvolveram a doença, implicando diretamente na transmissão intra-espécie (AN *et al.*, 2003; GIGLIOTTI *et al.*, 2003).

A possibilidade de transmissão de PCP de pessoa para pessoa foi primeiramente relacionada a surtos de PCP em unidades de transplantes e oncologia (MORRIS & NORRIS, 2012). Outra evidência foi a demonstração de DNA de *Pneumocystis* em 80% das amostras de ar coletadas dentro do quarto de paciente hospitalizado com PCP, esta porcentagem diminuiu quando as

amostras foram coletadas fora do ambiente que se encontrava o paciente, por exemplo, no corredor do hospital (CHOUKRI *et al.*, 2010).

Outra demonstração que sustenta este mecanismo de infecção seria a presença de mutação no gene que codifica a enzima dihidropteroato sintase (DHPS), estas mutações ocorrem quando o indivíduo é exposto a medicações contendo sulfonamidas, tais como trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX). Alguns estudos demonstraram estas mutações em pacientes com PCP sem previa exposição a sulfas, sugerindo que eles adquiriram a doença de pacientes que tinham história de terem sido tratados com sulfas (HAUSER *et al.*, 2010).

Profissionais de saúde também poderiam estar atuando nesta cadeia de transmissão por poderem ser carreadores de *Pneumocystis*. Estudos realizados com imunofluorescência indireta nestes indivíduos demonstraram a presença de anticorpos anti-*Pneumocystis* em amostras biológicas obtidas da cavidade oral e nasal (MORRIS & NORRIS, 2012).

O mecanismo de transmissão *de novo* é de grande importância clínica e de saúde pública. Por exemplo, se a reativação de uma infecção latente fosse a principal causa de PCP, medidas preventivas, como isolamento de pacientes com PCP seriam mandatórias, evitando a transmissão pessoa-pessoa.

Alternativamente, se a transmissão pessoa-pessoa fosse a chave para o desenvolvimento da doença, o contato com indivíduos infectados, particularmente indivíduos imunocomprometidos, seria muito importante. Situação idêntica acontece se algum ambiente particular fosse detectado como reservatório deste microrganismo, pacientes do grupo de risco seriam aconselhados a evitar a exposição a estes ambientes.

1.5 - CICLO DE VIDA, MORFOLOGIA E PATOGENIA

A nomenclatura clássica de parasitas já foi discutida e em 1998 foi revista, com isso, os cistos, corpos intracísticos e trofozoítas foram renomeados como asco, esporos e leveduras, respectivamente (HANANO 1998).

O ciclo de vida de *P. jirovecii* é bastante complexo e apesar de já ser conhecido em alguns dos seus traços fundamentais, ainda não está totalmente esclarecido. Mediante a realização de biópsias em pulmões foi observado que *Pneumocystis* possui vários estágios de desenvolvimento, apresentando leveduras e ascos, ambas com dupla membrana celular, característica comum encontrada nas diversas fases do organismo (SOUZA *et al.*, 2005).

Os ascos possuem uma parede celular espessa, oval e são estruturas que medem aproximadamente 5 a 8 μm de diâmetro. As leveduras têm uma estrutura celular mononuclear (haplóide) e são menores (2 a 5 μm), apresentando uma parede celular fina, variável na sua forma.

Destacam-se ainda formas intermédias, que possuem uma parede celular espessa e têm um tamanho que oscila entre 4 a 8 μm . As análises efetuadas nos ascos revelaram ainda a formação de esporos, normalmente em número de oito, de formato esférico, que, ao libertarem-se transformam-se em leveduras (THOMAS & LIMPER, 2007).

Baseando-se em todas estas formas, Cushion e cols. (1988), recorrendo à microscopia eletrônica de transmissão (TEM), defenderam a existência, em todas as espécies de *Pneumocystis*, de duas formas de reprodução: uma forma assexuada, que se opera por mitose, mediante a cisão binária da estrutura celular do trofozoíto e subsequente formação de uma estrutura diplóide que vai aderir ao epitélio alveolar; uma forma sexuada, que ocorre pela meiose que dá origem à formação e amadurecimento dos ascos e que culmina com a libertação dos esporos (MATSUMOTO & YOSHIDA, 1984 & THOMAS, & LIMPER, 2007).

A infecção inicia-se com a ocupação dos espaços aéreos pulmonares por exsudato rico em leveduras, o que provoca um desvio arteriovenoso, dando-se o espessamento da membrana alveolar e a inflamação do parênquima, com conseqüente edema e fibrose.

Desenvolve-se então a forma assexuada, replicando-se por mitose na estrutura haplóide das leveduras, com a formação de estruturas diplóides que, na fase mais abundante da infecção, aderem ao epitélio alveolar, especialmente às células epiteliais alveolares do tipo I.

A adesão das leveduras à membrana plasmática da parede celular do hospedeiro dá-se através da ação da glicoproteína principal de superfície (MSG), ou glicoproteína A, presente na superfície da parede celular do microrganismo, é a responsável pela ligação específica que se estabelece com os receptores nos macrófagos do hospedeiro (POTTRATZ *et al.*, 1991).

Ocorrida a adesão das leveduras ao epitélio alveolar, as leveduras (frequentemente agregadas ou agrupadas) são sujeitas a inclusões de glicogênio, formando-se no seu núcleo complexos sinaptonêmicos reveladores da ocorrência de divisões meióticas, as quais estão na base da formação dos ascos que, assim (de forma sexuada), vão se reproduzindo através de um fenômeno de divisão nuclear múltipla.

Os ascos vão amadurecendo à medida que se reproduzem. Atingida a sua maturidade, os ascos apresentam normalmente oito núcleos, formando-se um número igual de esporos (SCHUH *et al.*, 1997; DEI-CAS, 2000), os quais, após excisão através de poros localizados na parede celular espessa do asco, transformam-se em leveduras em estado vegetativo, assim terminando a reprodução sexuada (CUSHION *et al.*, 1988) [Figura 1].

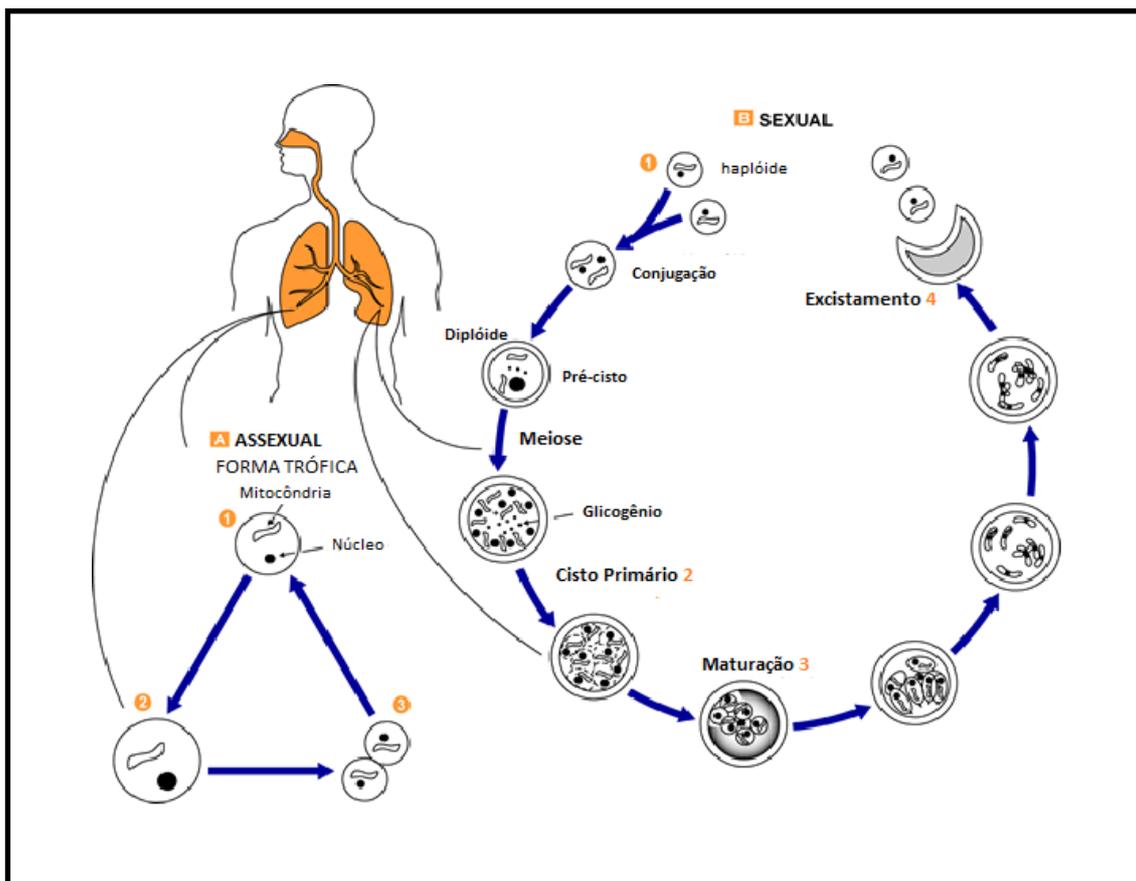


Figura 1: Esquema representativo do ciclo de vida (fase sexuada e assexuada) de *Pneumocystis* (Adaptado de Cushion M.T., 1998).

A atual incapacidade de cultivar *P. jirovecii* em um método de cultivo tradicional tem sido o maior obstáculo para o estudo do ciclo de vida desse agente. Estudos com a intenção de simular o ambiente alveolar com surfactantes pulmonares (fosfolípidos e proteínas específicas), homogeneizados de pulmão, e outros fatores de crescimento adicionados a meios de cultura, já foram realizados, mas não ajudaram no cultivo desse organismo.

Porém, estudos recentes com culturas de linhagem celular, mostram que *Pneumocystis* pode ser cultivado através dessa metodologia. Um estudo mostrou que o microrganismo pode ser mantido em uma linhagem celular (CuFI-8) derivada do pulmão de um paciente de 14 anos, portador de fibrose cística, representando um avanço para o estudo de *P. jirovecii* e possibilitando uma melhora na compreensão da biologia do fungo e abrindo novas linhas de

pesquisa, favorecendo a evolução de estudos que o envolvam (SCHILDGEN, 2014).

1.6 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os achados clínicos da PCP são geralmente decorrentes de sinais e sintomas relacionados ao parênquima pulmonar. A doença apresenta curso indolente e lento, geralmente subagudo, predominando dispnéia, febre baixa e tosse não produtiva (COURA, 2005). As manifestações clínicas da PCP podem variar segundo o estado imunológico do indivíduo (ISRAEL *et al.*, 1997; PEREZ & VAN DYKE, 2002) [Figura 2].

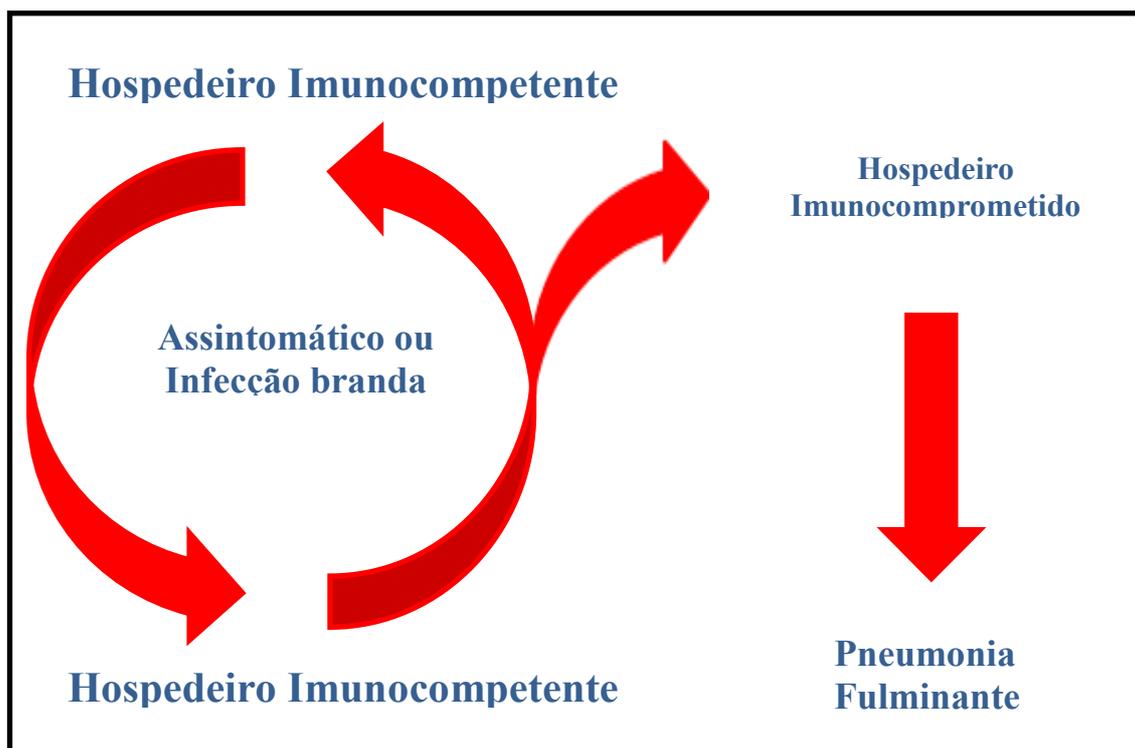


Figura 2: Variação de manifestações clínicas da Pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* dependendo do status imunológico do hospedeiro.

Em pacientes com aids, a PCP pode ser extremamente pleomórfica, com sintomas variando de semanas a meses de duração, sendo a febre, tosse e dispnéia progressiva as manifestações mais frequentes. Cabe salientar que a

aids é classicamente um fator de risco e de concomitância da PCP (GIGGLIOTI, 2014).

Outra característica da doença é a desproporção entre a sintomatologia clínica e a extensão das lesões radiológicas. O principal achado radiológico é um infiltrado intersticial ou alveolar difuso e bilateral (GIGGLIOTI, 2014).

Outros sintomas incluem fadiga, calafrios e emagrecimento, sinais e sintomas de acometimento extrapulmonar da doença também podem ocorrer. Estes também são pleomórficos, e variam de acordo com o órgão acometido. Já foram descritos infiltrados retinianos, massa tireoidiana, invasão da medula óssea, acometimento do canal auditivo, esplenomegalia e manifestações neurológicas (HUANG & STANSELL, 1996).

A associação de PCP com outros processos mórbidos ou infecciosos muitas vezes pode escapar ao acaso (ANONYMOUS, 2013). Tem sido relatado na literatura a concomitância de PCP com histoplasmose (TSCHUDY & MICHAIL, 2010, GAL *et al.*, 2013), com criptococose (JAVIER *et al.*, 2012), com tuberculose (NOWASEB *et al.*, 2014; SUK *et al.*, 2014) e com outras DIPs (BAVA *et al.*, 2011; ANONYMOUS, 2013). Geralmente, a doença/infecção é difícil de ser diagnosticada; entretanto, as alterações fisiopatológicas produzidas podem facilitar o aparecimento da doença associada. Portanto, torna-se importante detectar a presença dessas associações e sua repercussão na evolução dos pacientes com pneumonias fúngicas.

2 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1 - DETECÇÃO POR TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

As colorações têm sido altamente empregadas para células leveduriformes e ascos de *Pneumocystis* spp. Estas formas podem ser detectadas pelo Wright-Giemsa modificado (Diff-Quick), Gram Weigert, ou coloração de Hematoxilina & Eosina. Ascos podem ser corados com Grocott ou azul de toluidina. A coloração de Diff-Quick, quando comparada com o Grocott, é eficaz e vantajosa por ser um processo mais rápido e menos oneroso. A

técnica de Hematoxilina & Eosina mostra-se menos eficaz na detecção de *Pneumocystis* (KOVACS *et al*, 1998; MURRAY & MILLS, 1990; ODDÓ 1990; BENAVIDES, 1991; HUGHES & ANDERSON, 1991; RAAB *et al.*, 1994; TILEY *et al.*, 1994; DEI-CAS *et al.*, 1998).

A coloração pela prata metanamina (Grocott) é um método bastante utilizado por ser sensível e ter boa especificidade. É uma técnica bastante utilizada para diagnóstico de fungos, porém é preciso ter muita atenção na identificação do grumo característico de *Pneumocystis* spp, conhecidos como *honeycombs* ou favo-de-mel, para diferenciá-los, por exemplo, de formas de *Candida* spp. (presença de gemulação) e *Histoplasma capsulatum* (BIGBY *et al* 1996; WAZIR *et al* 1994).

As colorações de Grocott e azul de toluidina são úteis na demonstração dos ascos do fungo em tecidos, aspirados ou esfregaços (CASANOVA-CARDIEL *et al.*, 1996; BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; NIELSEN *et al.*, 1999).

Na técnica de azul de toluidina, o espécime é tratado de maneira que o fundo fique claro, devido à ação do reagente sulfato, tirando assim as interferências e com maior vantagem, por ser de fácil execução e realização em menor tempo. Nesta técnica as paredes dos ascos de *Pneumocystis* spp. são coradas em lavanda contra um fundo azul (GOSEY *et al* 1985; WITELSKY *et al* 1987; SETTNES & HENRIKSEN 1989; FELDMAN 1992; NIELSEN *et al* 1999; JENSEN *et al* 2001).

A coloração de Gram, apesar de não ser específica, proporciona a observação das duas formas do parasita (ascos e células leveduriformes), se assemelhando ao Giemsa (GOSEY *et al* 1985; FELDMAN, 1992).

Pela atual impossibilidade de cultivo de *P. jirovecii* em meios de cultura convencionais utilizados em micologia tais como Sabouraud, Mycosel entre outros, tem-se recorrido, em nível de diagnóstico laboratorial, à microscopia óptica, a qual tem permitido a visualização de formas císticas e tróficas do agente mediante a utilização de diversas colorações. Para tanto, amostras respiratórias, como escarro e escarro induzido, lavado broncoalveolar (LBA), e fragmentos de biópsia pulmonar são os mais utilizados (MORRIS & NORRIS, 2012).

Estes métodos apresentam diversas limitações, entre elas a falta de tolerância pelos pacientes à indução de escarro e métodos invasivos para obtenção do LBA e de biópsias. O treinamento de médicos patologistas para detecção em exames histopatológicos também é imprescindível para um bom diagnóstico de visualização.

2.2 - DETECÇÃO POR IMUNOENSAIOS

A implementação de técnicas imunológicas, principalmente a técnica de imunofluorescência com utilização de anticorpos monoclonais específicos para *P. jirovecii*, tem sido bem sucedida. Os anticorpos monoclonais desenvolvidos são capazes de se ligar à glicoproteína principal de superfície (MSG), que é a proteína de parede celular mais importante e abundante do fungo, presente em todas as formas evolutivas de *Pneumocystis*, permitindo, assim, o desenvolvimento de técnicas de imunofluorescência capazes de identificar por microscopia, rapidamente e de forma inequívoca, as formas císticas e tróficas de *P. jirovecii*, em diferentes materiais biológicos (ELVIN *et al.*, 1988; KOVACS *et al.*, 1988).

Uma das vantagens da técnica de imunofluorescência é a sua capacidade em detectar tanto as leveduras como os ascos de *P. jirovecii*. A sua sensibilidade, que gira em torno de 90,8% (PROCOP, 2004) quando comparada com as colorações convencionais, é muito elevada, conforme tem sido comprovado por diversos estudos realizados, nos quais tem sido observado que, mesmo em amostras biológicas com baixa carga parasitária, esta técnica revela-se muito sensível (KOVACS *et al.*, 1988; SHELHAMER *et al.*, 1996; CALIENDO *et al.*, 1998). Desta forma, a imunofluorescência vem sendo considerada como técnica de eleição para o diagnóstico de PCP.

Métodos baseados em imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais, que se ligam a um epítipo do microrganismo, mais especificamente uma glicoproteína que é resistente a formol e ácido pícrico (LUNDGREN, 1992), se mostram mais sensíveis e específicas, quando comparada com técnicas de colorações convencionais, devido à utilização dos anticorpos específicos para antígenos de *Pneumocystis spp.* Sendo assim

utilizados em pesquisa com humanos (WAZIR et al 1994, WAZIR, 2004), primatas, equinos (JENSEN et al, 2001) e suínos (KONDO *et al* 2000 & JENSEN *et al* 2001). Esta técnica se mostra 2,5% mais sensível que a coloração pela prata metanamina e 7,6% mais sensível que o método de Giemsa (WAZIR et al 1994, WAZIR & ANSARI 2004).

2.3 - DETECÇÃO MOLECULAR

Os avanços da biologia molecular causaram grande impacto no estudo dos microrganismos, já que passou a ser possível observar a sua complexidade genética. Para tanto foram desenvolvidas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR), de sequenciamento de ácido desoxirribonucleico (DNA) e por análises de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP), cariotipagem (PFGE) e conformação polimórfica de fita simples (SSCP) (BEARD *et.al.*, 2004) por exemplo.

As técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos genes dos microrganismos demonstram que, em cada microrganismo, determinadas sequências genéticas estão presentes, podendo ser observadas entre todos os indivíduos da mesma espécie, e que não se encontram ou são significativamente diferentes daquelas que podem ser observadas em outros microrganismos.

Desta forma, foi definitivamente demonstrado que *Pneumocystis* é um gênero que inclui uma grande diversidade de espécies, cada uma específica em relação ao respectivo hospedeiro, como sucede com *P. jirovecii* em relação ao homem. Esta heterogeneidade foi revelada através de tipagem molecular de regiões de genes mitocondriais e de genes nucleares, bem como de regiões espaçadoras no rRNA denominadas *Internal Transcribed Spacer* [ITS I e ITS II] (NIMRI *et al.*, 2002).

Estudos já mostraram que, além de proporcionar uma classificação taxonômica mais correta, a aplicação das técnicas moleculares ao estudo de *P. jirovecii* permitiu enormes progressos na compreensão da epidemiologia deste

fungo (incidência e distribuição geográfica), dos fenômenos que envolvem a sua forma de aquisição e transmissão e o seu ciclo de vida. Em termos globais, ficou facilitada a detecção molecular de *P. jirovecii* (GIGGLIOTI 2014).

O diagnóstico molecular de PCP se dá diretamente pela detecção de DNA do agente em amostras clínicas, mesmo quando a sua presença é muito reduzida e não é detectada pelos métodos de coloração e IFD. Entretanto, a detecção direta por PCR, do DNA de *P. jirovecii*, não constitui necessariamente diagnóstico de infecção, pois o microrganismo pode estar presente em sua forma latente. Todavia, a detecção não deixa de ser importante sob o ponto de vista clínico e epidemiológico, face à susceptibilidade do agente em provocar processo inflamatório que leve a um comprometimento pulmonar, ou encontrar condições favoráveis à sua proliferação, e possibilidade dos portadores assintomáticos o transmitirem a outros indivíduos (EL-SEIDI et al, 2008).

Com todos os trabalhos desenvolvidos, tem sido possível desenvolver técnicas de PCR cada vez mais específicas para *P. jirovecii*, o que se tem traduzido numa melhoria da rapidez e em um linear de detecção que pode ser de 10^4 a 10^6 vezes maior, quando comparados com aqueles que são obtidos com os métodos de visualização (LEIGH et al., 1993). Cabe salientar que a PCR mais utilizada até o presente detecta multicópias da subunidade maior mitocondrial do RNA ribossomal (mtLSUrRNA) (GUPTA 2009).

Outras metodologias moleculares alternativas a PCR também tem sido aplicadas ao diagnóstico da PCP. A detecção em soro de β (1-3) - glucana, um polissacarídeo encontrado na parede celular de *Pneumocystis* tem sido utilizada como um método não invasivo para o diagnóstico da PCP. Este método apresenta alta sensibilidade, mas sua especificidade é dependente do *kit* utilizado e da população estudada, e pode detectar outras micoses, como a aspergilose (MORRIS & NORRIS, 2012).

Outro método descrito na literatura especializada seria o método bioquímico para a detecção de S-adenosilmetionina (AdoMet) importante componente na reação de metilação e síntese de poliamina em *Pneumocystis* (MERALI et al., 2000). AdoMet não é sintetizado por este fungo e portanto, deve ser adquirida do hospedeiro. Com isso, tem sido postulado que baixa concentração de AdoMet no plasma poderia ser um marcador de PCP. Estudos

têm demonstrado que baixa concentração de AdoMet em pacientes foi diagnóstico presuntivo de PCP e o aumento destas concentrações corresponderam a uma melhora clínica (SKELLY *et al.*, 2000 *apud* MORRIS & NORRIS, 2012).

2.4 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PNEUMONIAS FÚNGICAS

Pneumonias fúngicas apresentam achados clínicos e radiológicos muito similares, e o diagnóstico laboratorial é difícil e frequentemente presuntivo (LAMOTH & ALEXANDER 2014, LETOURNEAU *et al* 2014). O diagnóstico radiológico pode contribuir na demonstração de pneumonia e seus padrões tais como lobular, intersticial ou infiltrados nodulares, mas não fornece dados para confirmação do patógeno. Os métodos convencionais de diagnóstico micológico, tais como exame direto e cultivo apresentam baixa sensibilidade e o resultado pode ser demorado (GRIFFIN & HANSON 2014).

As infecções fúngicas têm se tornado mais frequentes por causa da expansão da população de risco e do uso de modalidades de tratamento que permitem longa sobrevivência desses pacientes (NAGGIE & PERFECT 2009).

Algumas das mudanças nas infecções fúngicas endêmicas podem ser atribuídas às mudanças climáticas, extensão de habitat humano e facilidade de viagens. Populações de risco para infecções fúngicas oportunistas ou infecções fúngicas disseminadas endêmicas, incluem pacientes que receberam transplantes, aos quais foram prescritos, imunossupressores e agentes quimioterápicos (GUARNER & BRANDT 2011).

Atualmente, fungos que eram considerados não-patogênicos, são encontrados proveocando doenças em pacientes imunocomprometidos e um frequente problema encontrado por profissionais, é a ausência de técnicas que diferenciem colonização e infecção (GUARNER & BRANDT 2011).

A criptococose humana é causada por *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* é responsável pela maioria das infecções encontradas em indivíduos imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* causa infecção tanto em

hospedeiros imunocomprometidos quanto em hospedeiros imunocompetentes (HUSTON & MODY 2009).

C. neoformans possui distribuição mundial e é geralmente associado com guano de pombos, sendo a infecção por HIV é o fator predisponente mais frequente na criptococose (GALANIS *et al* 2010).

Independente das espécies, humanos inalam leveduras ou basidiósporos e o pulmão é o sítio de infecção primária, alguns indivíduos expostos permanecem assintomáticos, enquanto a maioria dos indivíduos imunocomprometidos desenvolve pneumonia (GALANIS *et al* 2010; HUSTON & MODY 2009; LYN *et al* 2009).

Em alguns pacientes com criptococose, as leveduras podem ser hipocapsuladas, havendo então a possibilidade de confusão com leveduras que possuem tamanho compatível, como *H. capsulatum* e *Candida* spp. (GAZZONI, SEVERO, SALLES, SEVERO 2009).

Testes utilizando partículas de látex para detecção do antígeno de *Cryptococcus* apresentam uma sensibilidade e especificidade de cerca de 90%, porém resultados falso-negativos podem ocorrer por causa da possível baixa carga fúngica ou efeito prozona ao passo que resultados falso-positivos podem ocorrer em pacientes infectados com *Trichosporon* spp ou *Klebsiella pneumoniae* e naqueles com fator reumatóide (HUSTON & MODY 2009).

Já o fungo *H. capsulatum* que é cosmopolita e causador da histoplasmose, que é adquirida por inalação de microconídios, é geralmente encontrado em construções antigas, cavernas e solos ricos em excretas de aves e morcegos, também pode ser confundido com outros microrganismos (KAUFFMAN 2009).

No diagnóstico diferencial da histoplasmose, alguns microrganismos causadores de infecções com sintomatologia compatível ou até mesmo estruturas fúngicas podem ser confundidos com *H. capsulatum*, quando cortes histológicos realizados em tecido estão sendo avaliados, é importante lembrar que a forma diminuta de *B. dermatitidis*, *C. neoformans* hipocapsulado, endosporos de *Coccidioides* spp, *P. jirovecii*, *Penicillium marneffeii* e *C. glabrata* podem ser confundidos com *H. capsulatum*, fazendo com que exista a

possibilidade de um diagnóstico equivocado (BUENO-FISCHER *et al* 2009; GUPTA *et al* 2009).

Além dos fungos, alguns parasitas também podem apresentar estruturas morfológicamente compatíveis com *H. capsulatum*, incluindo os agentes da leishmaniose, toxoplasmose e doença de Chagas. (GUPTA *et al* 2009).

A diferença nos exames histopatológicos entre esses organismos e *H. capsulatum* é que na coloração pelo H&E, todo o protozoário é corado, não mostrando o halo presente na parede celular fúngica (GUPTA *et al* 2009) e uma outra grande dificuldade no diagnóstico definitivo da histoplasmose é o crescimento em cultura, uma vez que o fungo pode levar até seis semanas para crescer (KAUFFMAN 2008).

Quando existe a suspeita de coccidioidomicose, é importante suspeitar também de outras micoses pulmonares e com os agentes de outras micoses. As esférulas, endósporos que estejam fora das esférulas ou esférulas sem endósporos de *Coccidioides immitis* são estruturas que podem ser confundidas com *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Emmonsia*, *Candida*, *Pneumocystis* e suas respectivas infecções. É muito importante ser lembrado que em pacientes imunossuprimidos, mais de uma infecção pode ocorrer ao mesmo tempo, em áreas de endemicidade, *Pneumocystis* e *Coccidioides* já foram encontrados no mesmo espécime (SAUBOLLE 2007).

O diagnóstico diferencial da pneumonia causada por *P. jirovecii* também inclui a histoplasmose e conseqüentemente *H. capsulatum*. No contexto clínico-patológico, os corpos intracísticos de *Pneumocystis* são a chave para a diferenciação de *H. capsulatum*. No entanto, *Pneumocystis* pode ser dificilmente diferenciado de *H. capsulatum* quando está presente dentro de um granuloma ou quando a doença é extrapulmonar (GUARNER & BRANDT 2011).

O diagnóstico das micoses é demorado e trabalhoso, porque geralmente necessita da identificação do fungo na amostra biológica, por meio de cultura, histopatologia ou exame direto com coloração específica (KAPLAN JE, 2009).

A falta de infraestrutura técnica e insumos para realizar diagnóstico dessas infecções fúngicas oportunistas, como, meio de cultura específico, profissionais especializados para realizar procedimentos invasivos (como

punção lombar e biópsia de medula óssea), técnica de imunofluorescência, ainda podem retardar o diagnóstico dessas infecções, consequentemente atrasando o início de uma terapia adequada, no entanto, métodos moleculares demonstram melhor sensibilidade e especificidade quando comparados a esses métodos tradicionais e podem suprir as limitações dos testes de rotina (ADENIS AA, 2014).

3 – TRATAMENTO

O tratamento de primeira escolha para todas as formas de infecção por PCP é a associação de sulfametoxazol (SMX) – trimetoprim (TMP). A atividade antimicrobiana desta associação resulta do bloqueio enzimático em duas etapas da síntese do ácido tetra-hidrofólico. A sulfonamida inibe a incorporação do ácido para-aminobenzóico (PABA) em ácido fólico e o trimetoprim previne a redução do ácido di-hidrofólico para tetra-hidrofólico (Figura 3).

A droga é administrada via oral ou intravenosa na dose de 15 a 20 mg/kg/dia de TMP e 75-100 mg/kg/dia de SMX em 3 a 4 doses diárias por 21 dias. A preparação parenteral está indicada para pacientes com dificuldade de ingestão oral e nos casos graves da doença. Os pacientes que evoluem com melhora do quadro clínico e remissão dos sintomas durante o tratamento intravenoso inicial podem terminá-lo com a medicação via oral.

Durante os primeiros dias de tratamento, em alguns pacientes podem ocorrer piora dos sintomas respiratórios, devido à resposta imune exacerbada do hospedeiro ao fungo e por haver grande liberação de fatores inflamatórios induzidos pela presença dos antígenos do fungo em destruição.

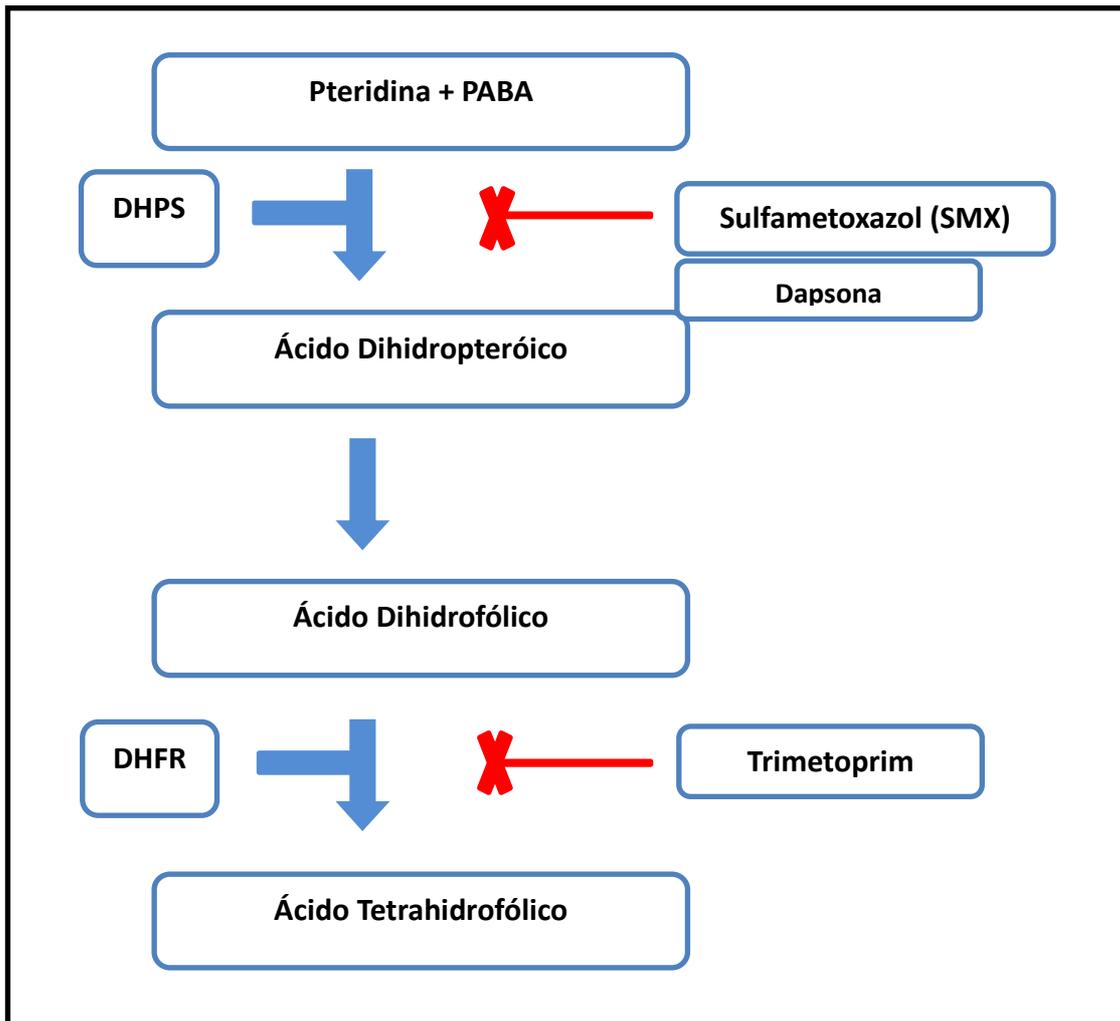


Figura 3: Mecanismo de ação da combinação das drogas Sulfametoxazol e Trimetoprim inibindo as enzimas DHPS e DHFR.

A maior limitação ao uso do SMX-TMP reside na frequência de efeitos colaterais que usualmente se iniciam durante a segunda semana de tratamento. São comuns: *rash* cutâneo, febre, neutropenia e outras citopenias, náuseas e vômitos, hepatite, hipercalemia, pancreatite e nefrite (WARTON *et al.*, 1986).

Estudos também já recomendaram o uso de corticóide para todos os pacientes com PCP de intensidade moderada à grave visando à diminuição do processo inflamatório e da fibrose pulmonar. Deve ser usada a seguinte forma: prednisona 40 mg via oral (VO) duas vezes ao dia do 1º ao 5º dia, 40 mg VO uma vez ao dia do 6º ao 10º dia seguidos de 20 mg VO uma vez ao dia do 11º ao 21º dia (SISTEK, 1992).

Uma alternativa no tratamento dos pacientes com PCP é a associação de clindamicina na dose de 600 mg três vezes ao dia/intravenosa (IV) com a primaquina 15-30mg/dia VO por 21 dias. O mecanismo de ação destas drogas faz com que ocorra a inibição da síntese proteica dependente de RNA, por meio da ligação em receptores localizados na porção 50S do ribossomo, impedindo as reações de transpeptidação e translocação e os principais efeitos colaterais incluem; *rash* cutâneo, metemoglobinemia, hemólise, distúrbios gastrintestinais e neutropenia transitória. O isotionato de pentamidina é uma diamidina que também tem sido utilizada, porém o mecanismo de ação contra *P. jirovecii* também é desconhecido. Pode ser administrada via intravenosa ou inalatória. Esta última produz altas concentrações da droga no pulmão, mas é ineficaz no tratamento e profilaxia da doença extrapulmonar. O principal uso clínico da pentamidina inalatória reside na profilaxia da pneumonia por *Pneumocystis*. A droga deve ser administrada na dose de 4 mg/kg/dia IV diluídos em 100 mL de soro glicosado a 5% infundidos durante 1 a 2 horas durante 21 dias. Efeitos colaterais ocorrem em mais de 80% dos pacientes e requererem a descontinuação da droga. São eles: azotemia, arritmias cardíacas, neutropenia, hipoglicemia, pancreatite, hipocalcemia, hipomagnesemia e alterações hepáticas (WARTON *et al.*, 1986).

Outra alternativa no tratamento da pneumocistose, é o uso de dapsona (DDS), que inibe a síntese do ácido dihidrofólico na dose de 100 mg/dia VO associada a TMP 15 mg/kg/dia por 21 dias. A resposta clínica ao tratamento é muito boa quando associada ao TMP, pois essa associação pode ser usada como uma segunda linha de tratamento quando o paciente apresenta alguma contraindicação ao SMX-TMP (COOLEY 2014).

4 – JUSTIFICATIVA

A detecção de patógenos circulantes numa determinada região ou comunidade e o conhecimento de suas características são de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de tratamento, prevenção e controle de doenças infecciosas, possibilitando também a previsão de surtos graves antes mesmo que estes se estabeleçam.

Infecções fúngicas tem sido uma grande ameaça nas últimas décadas para a população em geral, e especialmente para os indivíduos com comprometimento em seu sistema imune. Embora a população, em geral, possa ser acometida, os indivíduos com comprometimento do sistema imune são particularmente susceptíveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas. Aquelas que acometem o trato respiratório continuam sendo importantes problemas de saúde pública no Brasil, com elevada taxa de morbidade/mortalidade. Dentre estas, a histoplasmose, a criptococose e a PCP têm se destacado, devido à baixa de imunidade da população e à ocorrência de infecções concomitantes, como a aids. As infecções fúngicas também são complicações muito graves associadas à elevada mortalidade, em pacientes neutropênicos, em decorrência do tratamento utilizado nas doenças neoplásicas (PARK 2014).

Métodos usados rotineiramente baseados no cultivo dos agentes etiológicos destas infecções geralmente se limitam na detecção dos organismos em pacientes em um estágio já avançado da doença. Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas à epidemiologia e diagnóstico das infecções fúngicas, bem como na taxonomia de seus agentes etiológicos.

A PCP, uma importante infecção em pacientes com aids, tem merecido especial atenção para o seu diagnóstico, e embora sua incidência em países desenvolvidos tenha declinado, resultante da profilaxia e terapia antirretroviral, ainda é um importante problema em países em desenvolvimento, como o Brasil. Além disso, o uso indiscriminado de SMX-TMP em pacientes infectados com HIV pode levar a um aumento na resistência de *P. jirovecii* a este fármaco (WHO 2004).

A introdução da PCR em diagnósticos microbiológicos tem sido estabelecida em pesquisas laboratoriais como uma valiosa alternativa para os métodos tradicionais. Rapidez, bom limite de detecção e especificidade são as maiores vantagens deste método (MORRIS & NORRIS, 2012). Ensaio utilizando PCR têm sido amplamente usados no diagnóstico da PCP nos países desenvolvidos, uma vez que apresentam excelente sensibilidade e especificidade quando comparados com as metodologias tradicionais.

O desenvolvimento e validação de métodos moleculares, sensíveis e específicos, são fundamentais para o diagnóstico da PCP, principalmente nos casos de infecções disseminadas onde se torna difícil a obtenção de adequado material clínico para exame, e é necessário um diagnóstico rápido.

Os métodos moleculares são mais rápidos, apresentam maior sensibilidade e especificidade. Os conhecimentos adquiridos possibilitarão a determinação de alguns parâmetros com mais precisão, como a incidência e prevalência desta infecção em nosso meio. Com isso, uma conduta clínica e preventiva mais acurada será permitida e, conseqüentemente, os custos dos cuidados médicos serão reduzidos, mas com um aumento na qualidade de vida dos pacientes, principalmente daqueles com grave deficiência no sistema imune.

A tecnologia da (PCR) apresenta um grande potencial para a detecção de fungos patogênicos, uma vez que detecta diretamente a presença de DNA fúngico em fluidos orgânicos, com alta sensibilidade e especificidade. Devemos salientar que, para padronizar novas técnicas, a comparação com técnicas já existentes e de uso rotineiro em laboratório clínico é fundamental.

5 – OBJETIVO

Identificar estratégias para melhorar o fluxo do diagnóstico laboratorial da PCP através da comparação entre métodos usados para detecção do microrganismo ou do material genético do mesmo, visando maior rapidez e precisão no diagnóstico laboratorial desta micose.

5.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar método rápido de detecção molecular, PCR, em amostras respiratórias provenientes de pacientes do INI.
- Comparar o desempenho do método molecular (*nested* PCR) com as técnicas de coloração, Imunohistoquímica e reação de imunofluorescência utilizados rotineiramente em Micologia;
- Comparar o desempenho de duas metodologias moleculares: *nested* PCR e PCR multiplex em tempo real (qPCR) em amostras respiratórias para o diagnóstico de PCP;
- Detectar outros agentes etiológicos de pneumonia fúngica por métodos moleculares nas amostras respiratórias de pacientes com suspeita de PCP.

6 - METODOLOGIA

6.1 - DESENHO DO ESTUDO:

Estudo transversal

6.2 - CASUÍSTICA:

Para avaliação das metodologias propostas foram incluídos 40 espécimes clínicos, entre escarro espontâneo, escarro induzido, aspirado brônquio-traqueal, lavado bronco-alveolar, encaminhados ao Laboratório de Micologia, de pacientes com suspeita clínica de PCP. As amostras foram divididas para a realização de imunoenaios, técnicas histopatológicas, moleculares e cultura.

Cálculo do tamanho amostral: Não existe ainda nenhum estudo sobre este tema. Este é um estudo piloto e a amostra é de conveniência (n=40), considerada adequada para este tipo de estudo.

Critério de inclusão: Indivíduos maiores de 18 anos com história clínico-epidemiológica compatível com micose oportunista, com pneumonia fúngica e imunodeprimidos cujas amostras respiratórias foram consecutivamente encaminhadas aos Setores de Diagnóstico Micológico e Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia do INI, no período de Janeiro de 2013 a maio de 2014.

Critério de exclusão: Indivíduos cujos espécimes clínicos coletados fossem insuficientes para realização das metodologias propostas.

Diagnóstico de PCP: Utilizamos como diagnóstico a junção de todos os dados clínicos e laboratoriais. Foi utilizado como critério clínico de classificação um sistema de pontuação indicativo da probabilidade de um paciente ter PCP ou não baseado no sistema proposto por Smith, Forbes & Gazzard (1992) (Tabela 5 e 6)

6.3 - REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA PARA DIAGNÓSTICO DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* [*Segundo recomendações do fabricante (MERIFLUOR)*]

As amostras respiratórias foram previamente processadas com o agente mucolítico Ditioneitol (DTT) em solução a 0,1%, com a finalidade de diminuir a viscosidade, da amostra. Posteriormente, as amostras tratadas foram homogeneizadas com auxílio de um *vortex* e incubadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos, com posterior centrifugação a 11.5G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e com auxílio de uma pipeta o sedimento celular foi retirado e aplicado em movimentos circulares no orifício delimitado na lâmina fornecida pelo *kit* até seu total preenchimento, o que compreende cerca de 50µl. O processo de secagem das lâminas foi realizado à temperatura ambiente. Posteriormente, as mesmas foram fixadas com acetona PA. A revelação da reação se deu através da utilização de 50µl do reagente contendo anticorpo monoclonal, conjugado com isotiociano de fluoresceína (FITC) e incubação das lâminas a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. O excesso de anticorpo foi removido das lâminas, e logo em seguida, foi realizada a adição de uma gota do reagente de montagem sobre as células fixadas, e cobertura com lamínula para observação em microscópio de fluorescência, numa absorvância de 490-520nm, sendo resultado positivo amostras que possuam dois ou mais cistos típicos de *P. jirovecii* e morfologia compatível com coloração fluorescente verde-maçã e sendo resultado negativo a ausência de estruturas compatíveis.

6.4 - TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA (*Segundo recomendações do fabricante – Kit HiDef Detection Polymer system – CellMarque*)

Seguindo o protocolo do Serviço de Anatomia Patológica do INI, as amostras foram tratadas com fixador *cell block* para a formação de um grumo celular. Após esse passo, foi realizado a parafinização do material celular e realização dos cortes histológicos, na espessura de 3 a 4 µm. Os cortes foram fixados nas lâminas silanizadas, que possuem um tratamento para que os cortes teciduais possam ser fixados eletrostaticamente e em seguida foram deixadas em estufa a 56°C por no mínimo 1 hora para adesão dos cortes à

lâmina. Imediatamente após a retirada da estufa, as lâminas foram colocadas em cubas com xilol para a total retirada da parafina. Em seguida as amostras foram desidratadas em álcool absoluto e em seguida foi realizada uma lavagem em água corrente para a retirada de reagentes químicos. As amostras passaram por bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio PA, lavagem em água corrente, recuperação antigênica (processo que permite o reconhecimento antigênico seja facilitado, após o mesmo ter sido possivelmente prejudicado pela ação da fixação com o formol) e em seguida incubadas *overnight* com anticorpos (3F6) contra um carboidrato que compõe uma glicoproteína de *P. jirovecii*. No dia seguinte foi realizada a revelação com a utilização da DAB e ao chegar à revelação ideal, o processo foi interrompido com a utilização de água e contra coloração com hematoxilina e por final foi realizada a montagem das lâminas usando lamínula e bálsamo do Canadá e observadas ao microscópio ótico em um aumento de 400x, sendo o fundo arroxeadado e as estruturas de interesse, acobreadas.

6.5 - COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA & EOSINA

Após a parafinização das amostras e os respectivos cortes, o excesso de parafina foi retirado e as amostras fixadas na lâmina de microscopia após acondicionamento em estufa de microscopia. Em seguida o excesso de parafina foi retirado por meio de banhos com xilol 100% e posteriormente foram re-hidratadas em 3 a 5 trocas de álcool 99%. As amostras foram lavadas em água corrente e em seguida em água destilada. Após esse passo, as lâminas foram submersas na hematoxilina por 5 a 10 minutos e lavadas em água corrente. Em seguida procedeu-se a imersão das lâminas em eosina, lavagem em álcool absoluto para retirada do excesso de corante e montagem das lâminas com lamínula e bálsamo do Canadá. Ao final procedeu-se a observação das estruturas celulares em microscópio ótico em 400x, sendo as estruturas basófilas coradas pela Hematoxilina e as estruturas acidófilas coradas pela Eosina, sendo azul arroxeadado e rosa respectivamente.

6.6 - IMPREGNAÇÃO PELA PRATA-METANAMINA (MÉTODO DE GROCOTT)

Inicialmente, as amostras respiratórias foram tratadas com o fixador *cell-block* (Etanol 100%, Formaldeído e Ácido acético glacial) e em seguida foram fixadas em lâminas de microscopia com álcool 95%, imersas em ácido crômico por 10 minutos, (para promover a oxidação das estruturas celulares), e lavadas com água filtrada. Posteriormente, as lâminas fixadas foram cobertas com metabissulfito de sódio a 1% para retirar o excesso de ácido crômico, e novamente lavadas em água corrente filtrada. As lâminas foram então, banhadas em solução de nitrato de prata-metanamina 50%, aquecida à temperatura de 90°C; lavadas com água destilada e cobertas com hipossulfito de sódio PA por 1 minuto, para acentuar a fixação da prata pelos fungos. As lâminas foram contra coradas com corante verde-luz por 3 minutos, para que houvesse um fundo com uma cor diferente da que a coloração pela prata produz, sendo o fundo verde e as estruturas celulares, variando do castanho ao negro. Em seguida as lâminas foram lavadas com diferentes concentrações de etanol 70%, 95% e absoluto, xilol e montadas usando bálsamo do Canadá, e observadas ao microscópio óptico em 400x.

6.7 - REAÇÃO DE CALCOFLUOR

Para realizar a técnica de Calcofluor, foi obedecido o protocolo estabelecido pelo fabricante (SIGMA-ALDRICH), seguindo todas as orientações de, numa lâmina de microscopia, acrescentar uma gota da amostra a ser observada, uma gota de Hidróxido de Potássio 10% (KOH) e cobrir com uma gota do reagente de Calcofluor, examinando ao final no microscópio de fluorescência em aumento de 400x.

6.8 - CULTURA

As culturas foram realizadas em meio Sabouraud e Mycosel e incubadas em temperatura ambiente com a finalidade de confirmar os possíveis achados nos outros testes do estudo. Após a incubação por quatro semanas, as culturas foram analisadas, havendo crescimento, os fungos foram identificados macro e

micromorfológicamente e não havendo crescimento após as quatro semanas de incubação, as culturas foram desprezadas.

6.9 - EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS

A extração foi realizada com o kit comercial QIAamp DNA mini kit – (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. A partir de 200 µl de amostra respiratória cinco etapas foram realizadas: lise celular com tampão de lise, precipitação de proteína e degradação de possíveis proteínas inibidoras da PCR pela proteinase K, adsorção do DNA em coluna de sílica; processo de lavagem para eliminação de resíduos contaminantes, e eluição dos ácidos nucleicos com tampão de eluição AE, composto por 1mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA e pH 9,0.

6.10 - PCR PARA β-GLOBINA

Para analisar a hipótese de um possível inibidor de reação presente nas amostras a serem analisadas, foi realizada uma PCR direcionada para o gene constitutivo que codifica a β-globina humana. O resultado esperado é a presença de positividade para o gene em todas as amostras analisadas por se tratar de material humano. A não ocorrência de amplificação caracterizaria a presença de inibidores na reação da PCR.

6. 11 - NESTED PCR para *P. jirovecii* [WAKEFIELD *et. al.*, 2002] e *H. capsulatum* [BIALEK *et. al.*, 2002]

A *nested* PCR é definida por usar duas reações e dois pares de *primers* distintos, um par externo e outro par interno, desenhado para uma sequência previamente definida dentro da primeira amplificação para melhorar a especificidade e a sensibilidade da técnica. A primeira reação ocorre normalmente, usando o DNA como molde e o diferencial acontece na segunda reação, que utiliza como molde uma alíquota da primeira amplificação. Estas duas etapas são realizadas separadamente e o fragmento genômico será amplificado utilizando os *primers* (Invitrogen) para *P. jirovecii*: pAZ 102-E, pAZ 102-H (*primers* externos), pAZ 102-X e pAZ 102-Y (*primers* internos) direcionados para o gene mtLSUrRNA. Já para *H. capsulatum* utilizamos como

alvo a sequência do gene que codifica uma proteína predita de 100kDa e os *primers* HCl e HCII (*primers* externos), HCIII e HCIV (*primers* internos).

As sequências nucleotídicas dos *primers* e as condições de ciclagens térmicas aplicadas às PCR estão demonstradas respectivamente nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: *Primers* utilizados na amplificação de sequência do gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii*, e do gene 100kDa de *H. capsulatum* por *nested* PCR e *primers* utilizados para amplificação de gene humano da β -globina por PCR convencional.

PCR	<i>primer</i>	Sequência	Deteção
β -globina humana	β globF β globR	5'-GCAAGAAAGTGCTCGGTGC-3' 5'-CACTCAGTGTGGCAAAGGTG-3'	β globina Humana
1ª reação <i>primers</i> externos	pAZ 102-E pAZ 102-H	5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3' 5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3'	<i>Pj</i>
2ª reação <i>primers</i> internos	pAZ 102-X pAZ 102-Y	5'-GGTATAGCACTGAATATCTC-3') 5'-AATTACTGTTCTGGGCTGTT-3'	<i>Pj</i>
1ª reação <i>primers</i> externos	Hc I Hc II	5'-GCGTTCCGAGCCTTCCACCTCAAC-3' 5'-ATGTCCCATCGGGCGCCGTGTAGT-3'	<i>Hc</i>
2ª reação <i>primers</i> internos	HcIII Hc IV	5'-GAGATCTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3' 5'-AGGAGAGAACTGTATCGGTGGCTTG-3'	<i>Hc</i>

Legenda: *Pj* = *Pneumocystis jirovecii* e *Hc* = *Histoplasma capsulatum*

Tabela 2: Condições de ciclagens térmicas aplicadas à *nested* PCR para o gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii*, para o gene HC100 que codifica a proteína predicta de 100kDa de *H. capsulatum* e PCR para o gene da β -globina humana.

PCR	Condições de amplificação	Ciclos
β-globina	Desnaturação Inicial - 95°C por 3min Desnaturação – 95°C por 30s Pareamento – 57°C por 30 s Extensão – 72°C por 30 s Extensão Final – 72°C por 10 min	45
<i>nested</i> PCR	Condições de amplificação	Ciclos
<i>P. jirovecii</i> 1ª reação	Desnaturação - 94°C por 1,5 min Pareamento - 60°C por 1,5 min Extensão - 72°C por 2 min	40
2ª reação	Desnaturação 94°C por 1,5 min Pareamento 61,7°C por 1,5 min Extensão - 72°C por 2 min	40
<i>nested</i> PCR	Condições de amplificação	Ciclos
<i>H. capsulatum</i> 1ª reação	Desnaturação Inicial – 94°C por 5 min Desnaturação 94°C por 30 s Pareamento 65° por 30 s Extensão 72°C por 1 min Extensão final 72°C por 5 min	35
2ª reação	Desnaturação Inicial 94°C por 5 min Desnaturação 95°C por 30 s Pareamento 67°C por 30 s Extensão 72°C por 1 min Extensão final 72°C por 1 min	35

6.12 - qPCR MULTIPLEX [GAGO et al, 2014]

Esta metodologia foi realizada por meio de uma parceria entre o laboratório de Micologia do INI e o Departamento de Micologia do Centro Nacional de Microbiologia - Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Espanha. Para a produção dos resultados, as amplificações foram executadas em termociclador LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Manheim, Alemanha) e direcionadas para a região ITS do rDNA. PCRs foram realizados em 20µl contendo 2X SensiMix DNA (Quantance Ecogen, Madrid, Espanha) de acordo com as instruções do fabricante, 0,5 µM de cada *primer* para cada uma das espécies testadas (Tabela 3), 0,25 µM do *primer* para o controle interno, 0,2 µM de cada sonda espécie-específica, 0,1 µM da sonda controle interno, 2 fg do plasmídeo (pICJF) controle da reação (controle interno) e 2 µl do DNA extraído das amostras respiratórias. Desnaturação inicial do DNA foi obtida com aquecimento a 95°C por 10 minutos. A seguir, a PCR foi realizada por 50 ciclos com 25 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de pareamento a 50°C, e extensão por 5 segundos a 72°C, seguido de um ciclo de resfriamento a 40°C por 30 segundos. Os resultados e análises desta metodologia foram obtidos pelo grupo colaborador mencionado acima.

Quadro 1: Sequências dos *primers* e sondas utilizadas na qPCR multiplex

Espécies/<i>primers</i> e sondas	Sequências^a
<i>Pneumocystis jirovecii</i> OLIPJMB1 (f) OLIPJMB2 (r) Sonda Pj-MB1	5'-CCC TAG TGT TTT AGC ATT TTT C-3' 5'-CTG CAA TTC ACA CTA CTT ATC G-3' CAAATCGCG-BHQ1-3'
<i>Histoplasma capsulatum</i>^b	Dados incluídos em patente
<i>Cryptococcus neoformans</i> OLI CRYPTO 1 2 (f) OLI CRYPTO 2 (r) Sonda MB CRYPTO	5'-CCT GTT GGA CTT GGA TTT GG-3' 5'-AGC AAG CCG AAG ACT ACC-3' GACAGGTAATCAAGATCGCG-BHQ1-3
Jellyfish (controle interno) Oli-icjf1 (f) Oli-icjf2 (r) Sonda CIJF-MB	5'-GCC TGG TGC AAAAAT TGC TTA TC-3' 5'-CTA AGA CAA GTG TGT TTA TGG TAT TG-3' CCAATCGCG-BHQ2-3'

^a BHQ1, *black hole quencher* 1

^b Sequências dos *primers* e sondas para *H. capsulatum* foram incluídos na patente PCT/ES2009070340

6.13 - CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL

Para correlacionar os resultados laboratoriais (IFD e *nested* PCR) e os aspectos clínicos dos pacientes, tabela de contingência 2x2 foram construídas e o teste exato de Fisher aplicado às mesmas. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

6.14 - ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo estabelece que as informações metodológicas e os resultados obtidos no mesmo são confidenciais, não devendo ser repassados a outros laboratórios ou divulgados publicamente sem prévia concordância dos envolvidos no estudo. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, como subprojeto do Projeto 645 (SGI-Submissão Pesquisa) e CAAE (CEP) 00580.0.009.000-09, tendo sido aprovado. Pacientes assinaram o TCLE (Anexo 1) e os pesquisadores envolvidos assinaram o termo de compromisso (Anexo 2)

7 – RESULTADOS

Durante todo o ano de 2013 e no primeiro semestre de 2014, foram recebidas 70 amostras respiratórias no laboratório de Micologia e obedecendo os critérios de inclusão e exclusão, apenas 40 amostras oriundas de 40 pacientes com suspeita de PCP foram incluídas no estudo, distribuídas na seguinte ordem: escarro induzido com 21 amostras (52,5% da amostragem), seguido de lavado traqueal com 11 amostras (27,5%), lavado broncoalveolar, com 5 amostras (12,5%) e a menor quantidade, escarro espontâneo, com apenas 3 amostras (7,5%).

O quadro 2 demonstra as características dos pacientes incluídos no estudo. Entre estes pacientes encontramos uma predominância do sexo masculino (72,5%). Quando avaliada a idade destes pacientes variou de 18 a 59 anos, com média de 37 anos e mediana de 38 anos, com um predomínio da faixa etária entre 20 a 39 anos (57,7%). Todos os pacientes eram portadores do vírus HIV, com aids, possuindo carga viral variável. De acordo com a classificação do CDC (1992) ficou evidenciado que o status imunológico dos pacientes baseados na contagem de linfócitos TCD4+, variou de um grau de imunocomprometimento moderado (15%) a grave (85%). (CDC, 1992)

Quadro 2: Características clínico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo ($n=40$)

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	30	75
Feminino	10	25
Idade		
18-19	1	2,5
20 – 39	23	57,5
40 – 59	16	40
HIV		
Positivo	40	100
Negativo	0	0
Carga viral		
Não informada	19	47,5
< 1.000	4	10
1001– 10.000	5	12,5
10.001– 100.000	2	5
>100.000	10	25
Contagem TCD4+		
< 10	3	7,5
11 – 50	7	17,5
51 – 100	17	42,5
>100 – 500	13	32,5
Tratamento		
SMX – TMP	40	100

O quadro 3 demonstra a classificação da probabilidade dos pacientes terem PCP baseado no sistema de pontuação proposto por Smith, Forbes & Gazzard (1992). Nesta população, podemos prever que 21 pacientes (52,5%) tinham PCP, já que de acordo com a classificação de Smith, Forbes & Gazzard (1992) apresentaram valores preditivos de PCP maiores que 82% (Quadro 4).

Quadro 3. Sistema de pontuação segundo Smith, Forbes & Gazzard (1992) e validade em prever PCP em 40 pacientes incluídos no estudo.

Característica	Número de pacientes	Pontuação
Pontuação Inicial	40	+3
Sintomas Clínicos		
Sim	09	+6
Não	31	-9
Sem profilaxia		
Sim	27	+7
Não	13	-9
Rx Tórax com infiltrados		
Sim	26	+12
Não	14	-6
Dessaturação		
Sim	16	+9
Não	24	-13
Possíveis pontuações		-34 a +37

Quadro 4: Probabilidade de PCP de acordo com score final.

Pontuação Final	Pacientes n (%)	Probabilidade PCP
<-3		
-3 a +6	19 (47%)	23%
>+6	10 (25%)	82-87%
>+19	11 (27,5%)	98%

Os resultados obtidos nas diferentes metodologias empregadas neste estudo estão disponibilizados no Apêndice A. Foram incluídos métodos convencionais, moleculares, carga viral e contagem de linfócito TCD4+.

7.1 - IMUNOENSAIOS

Dentre as 40 amostras estudadas, seis delas apresentaram resultado positivo na IFD, tendo sido observadas estruturas morfológicamente compatíveis com o fungo, corados por fluorescência cor verde-maçã correspondendo a 15% da amostragem estudada (Figura 4).

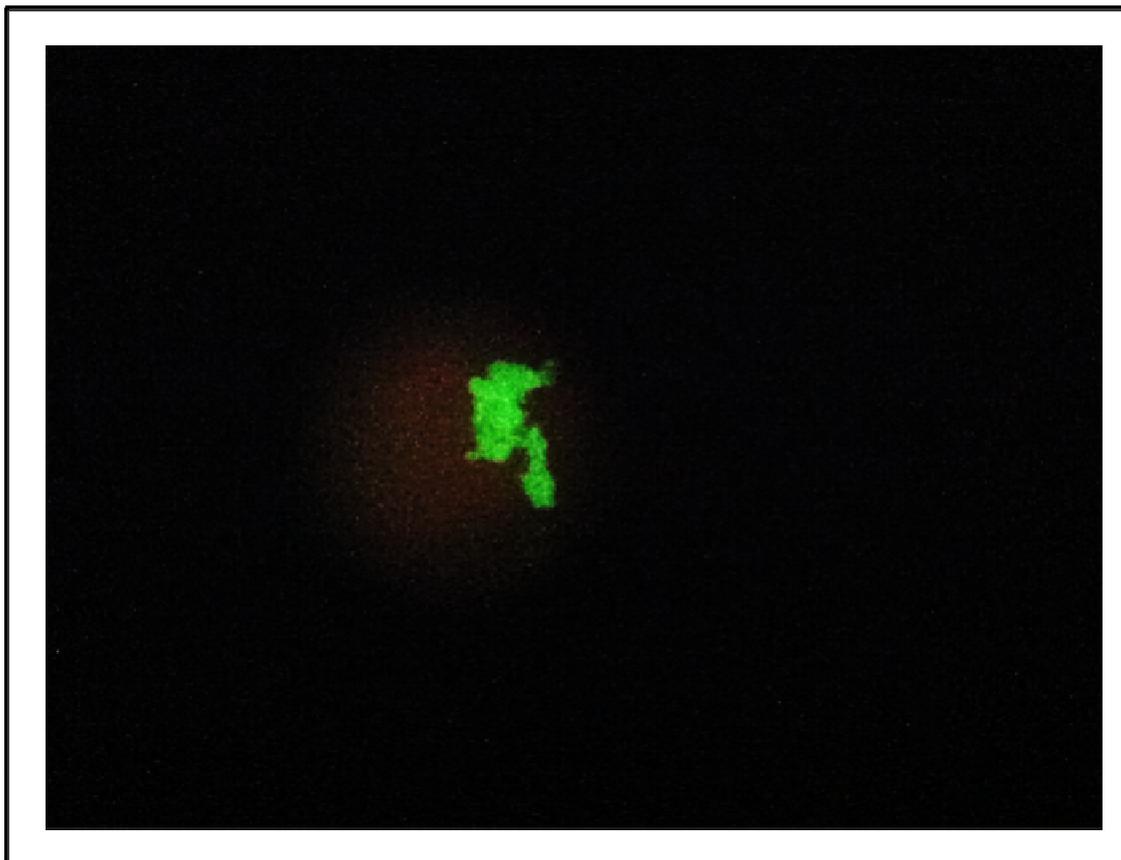


Figura 4: Representativo das amostras positivas para *P. jirovecii* na reação de imunofluorescência direta, com aumento de 400x.

As amostras também foram submetidas ao teste de imunohistoquímica, o qual utiliza anticorpo monoclonal contra um antígeno específico de *P. jirovecii* de 82kDa, detectando-o tanto nas formas císticas e trofozoítas. Porém, não foram observados resultados positivos (Figura 5).

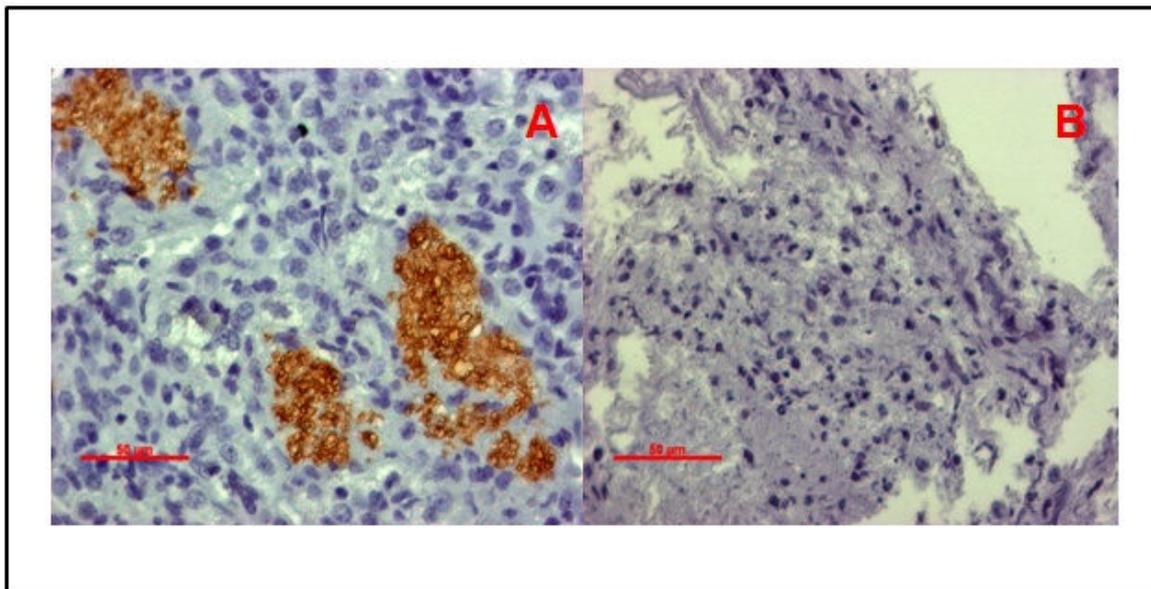


Figura 5: Demonstrativo dos espécimes clínicos submetidos à imunocitoquímica, (A) – Controle positivo, mostrando a ligação antígeno-anticorpo de tonalidade marrom e (B) – amostra do estudo mostrando não haver nenhum tipo de ligação, parâmetro que foi o mesmo para todas as amostras em aumento 400x.

7.2 - TESTES DE COLORAÇÃO

Na análise da coloração por Hematoxilina & Eosina pode-se observar dois parâmetros importantes, a evidência do microrganismo e a adequabilidade da amostra. Em 10 espécimes clínicos avaliados foram observados materiais com rara ou escassa celularidade (Paucicelular ou acelular) (Figura 6A). Mesmo assim, foram evidenciadas células características do trato respiratório tais como; células escamosas, cilíndricas e macrófagos alveolares; bem como polimorfonucleares (Figura 6B), e alguns artefatos (tecido vegetal) em um espécime clínico. Não foi observada a presença de microrganismos nesta coloração.

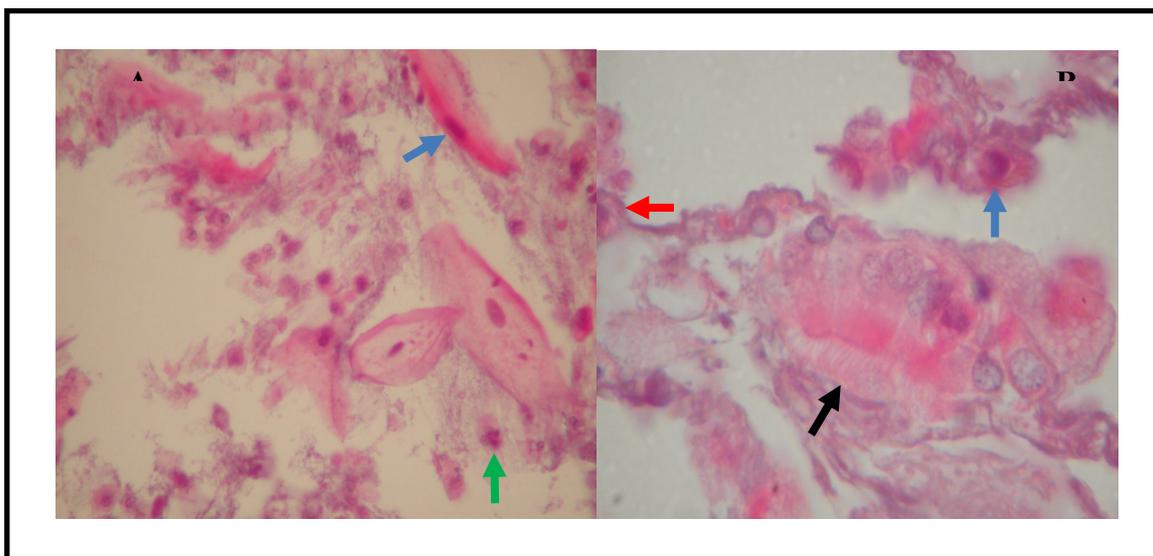


Figura 6: Representativo da avaliação da coloração por Hematoxilina & Eosina. (A): Amostra paucicelular, apresentando poucos neutrófilos (seta verde) e células escamosas (seta azul). (B): Célula escamosa (seta azul), célula cilíndrica (seta preta) e macrófago alveolar (seta vermelha). Aumento de 400x.

Na coloração pela prata metanamina, foram observados fungos em 52,5% das amostras estudadas; caracterizados pela presença de hifas, pseudohifas e estruturas leveduriformes (Figura 7). Houve a predominância do gênero *Candida* confirmadas pelo cultivo positivo para este gênero em 25% dos casos. Foi também evidenciada a presença de estruturas leveduriformes compatíveis com *H. capsulatum* (Figura 7) *P. jirovecii* e *Cryptococcus spp* em 3 amostras (7,5%) (Apêndice 1).

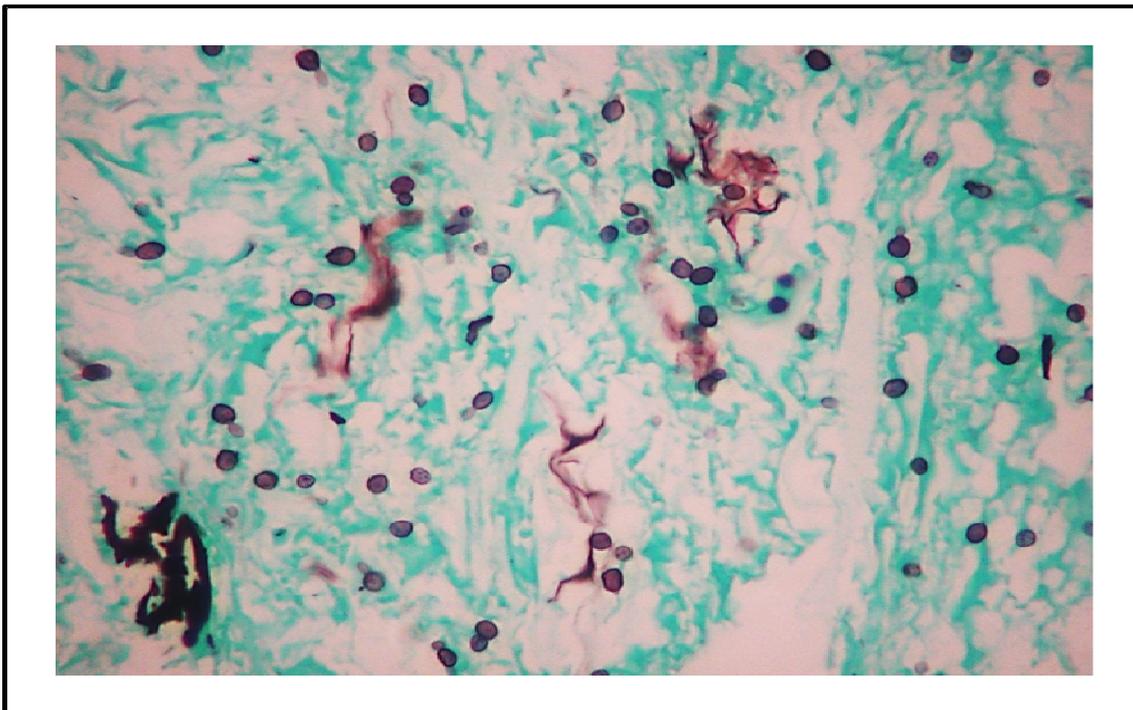


Figura 7 – Impregnação pela prata de grocott em cell block de escarro espontâneo de paciente com suspeita clínica de PCP. 400x. Caso nº 35 apresentando estruturas leveduriformes compatíveis com *H. capsulatum*.

Dentre todas as técnicas realizadas, o teste de calcofluor apresentou a menor sensibilidade, já que não foram observadas estruturas compatíveis com *P. jirovecii* em nenhuma das amostras incluídas no estudo.

Após a incubação de quatro semanas em temperatura ambiente, em meio Sabouraud e Mycosel, os resultados da cultura mostraram que não houve crescimento fúngico em 25 amostras (62,5%), houve crescimento de fungos do gênero *Candida* em 13 amostras (32,5%). Em uma amostra (2,5%) houve crescimento de *C. neoformans* e em uma cultura (2,5%), houve crescimento de dois microorganismos, *Candida* e *C. neoformans*.

7 . 3 - MÉTODOS MOLECULARES ENVOLVENDO ÁCIDOS NUCLEICOS

Após o processo de extração de DNA de amostras clínicas e realização da PCR para gene constitutivo humano que codifica a β -globina, observou-se que todas as amostras clínicas apresentaram resultados positivos, caracterizando assim, a não interferência de contaminantes inibidores de reação de PCR, bem como a integridade do DNA.

Para analisar a possibilidade de reação cruzada entre microrganismos e assim poder descartá-la, foi realizado um experimento inicial, onde os *primers* da reação de *P. jirovecii* foram testados contra DNA de outros microrganismos. O resultado desse experimento mostrou que houve reação cruzada, havendo amplificação apenas na amostra que tinha DNA de *P. jirovecii* (Fig. 8).

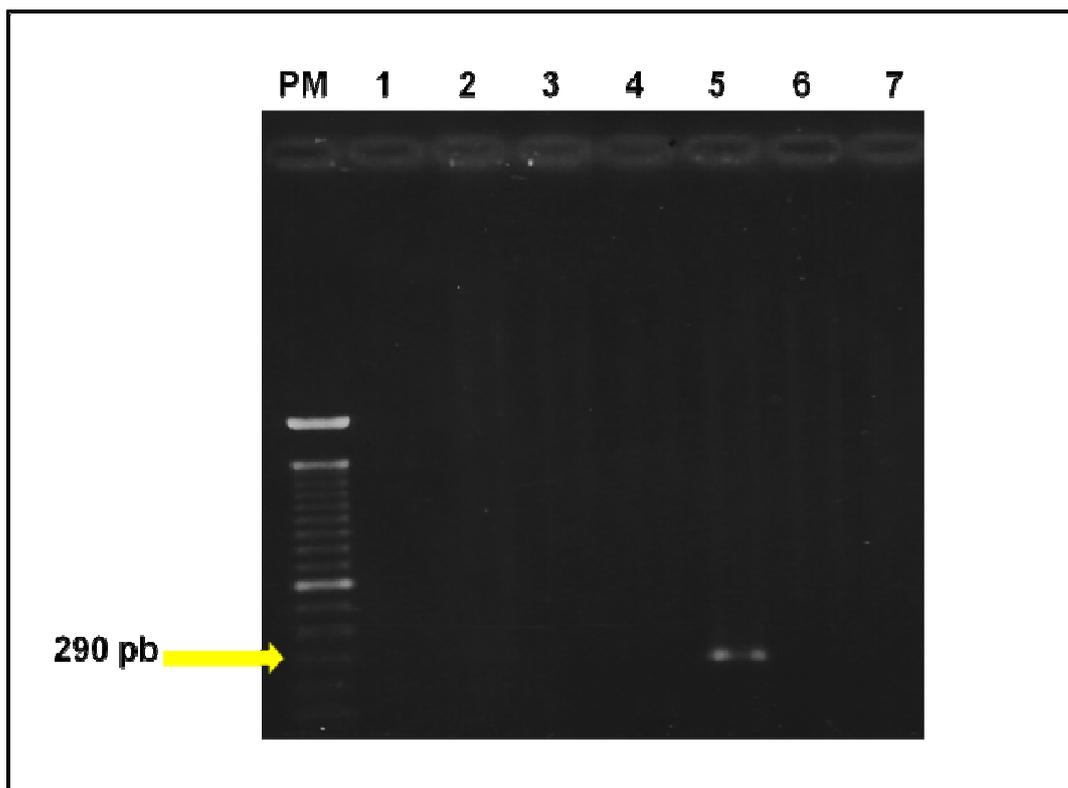


Figura 8 – Reação *nested* PCR utilizando *primers* de *P. jirovecii* contra DNA de outros fungos, 1-*Candida glabrata*, 2-*Cryptococcus neoformans*, 3- *Paracoccidioides brasiliensis*, 4- *Sporothrix schenckii*, 5-*Pneumocystis jirovecii*, 6-*Histoplasma capsulatum* e 7-Controle negativo.

Na busca de detectar a presença de *P. jirovecii* utilizando ácidos nucleicos em pacientes imunocomprometidos com pneumonias, a *nested* PCR utilizando *primers* direcionados para a subunidade maior do RNA ribossomal mitocondrial (mtLSUrRNA) foi o teste que apresentou o maior número de amostras positivas. Dentre as 40 amostras estudadas, doze apresentaram fragmentos de DNA de 290 pares de base representando assim, 30% da amostragem (Fig. 9).

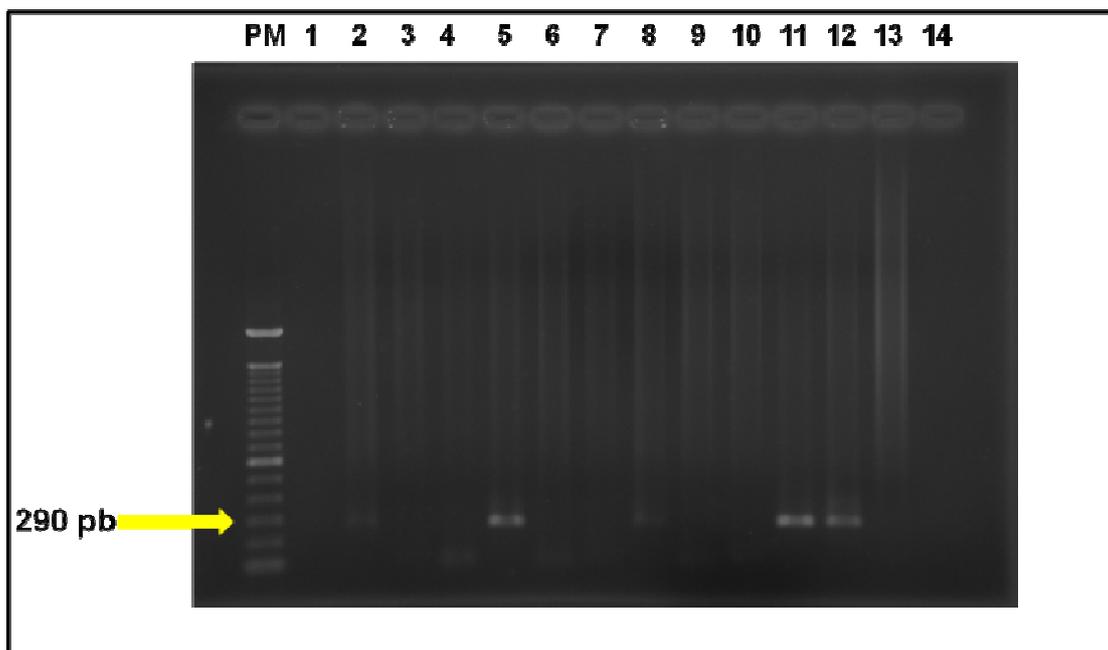


Figura 9 – Padrão de bandas após eletroforese em gel de agarose a 1% de amostras analisadas para *P. jirovecii* pela *nested* PCR, sendo as amostras 2, 5, 8, 11 positivas; amostra 12 – Controle positivo e amostra 14 – Controle negativo.

Para analisar a especificidade da *nested* PCR, foi realizado um experimento similar ao citado acima, desta vez, *primers* da reação de *H. capsulatum* contra DNA de outros fungos, havendo amplificação apenas na amostra que tinha DNA de *H. capsulatum*. (Fig. 10).

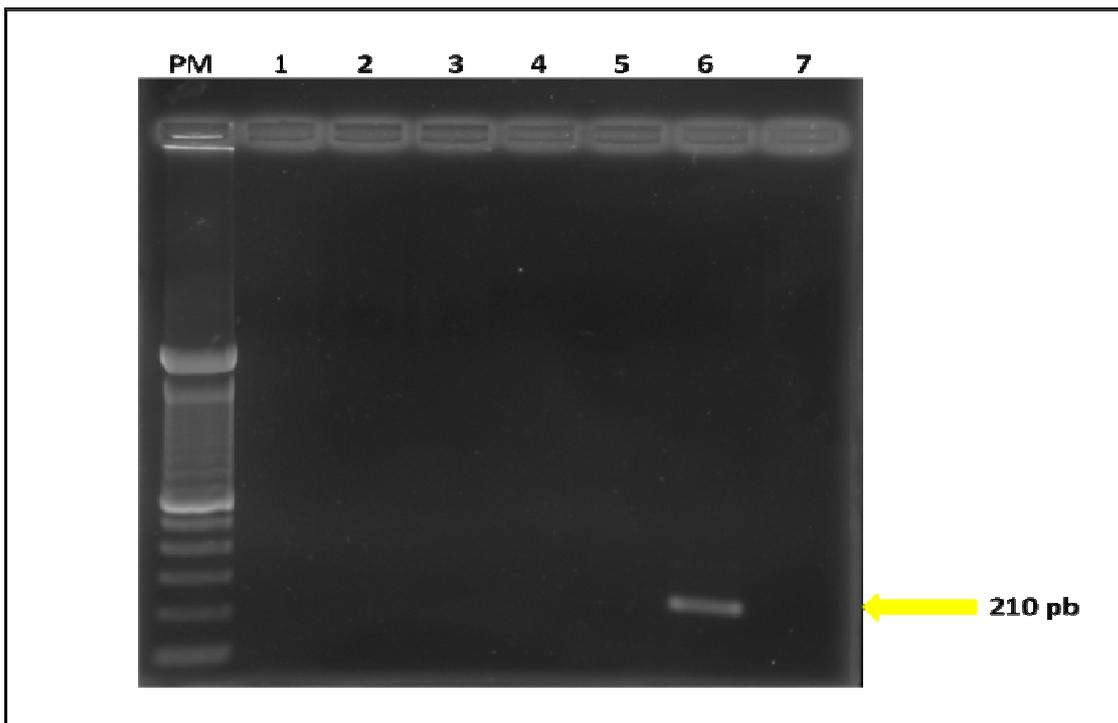


Figura 10 - Reação de amplificação com *primers* para *H. capsulatum* contra DNA de outros fungos. PM – Peso molecular, 1 – *Candida glabrata*, 2 – *Cryptococcus neoformans*, 3 – *Paracoccidioides brasiliensis*, 4 – *Pneumocystis jirovecii*, 5 – *Sporothrix schenckii*, 6 – *Histoplasma capsulatum* e 7 – Controle negativo.

Quando as amostras do estudo foram submetidas à *nested* PCR para *H. capsulatum* com *primers* direcionados para a sequência do gene HC100 que codifica a proteína de 100 kDa, detectou a presença do DNA do fungo em 28 amostras (70% da amostragem) através da amplificação de uma banda de 210 pares de base (Figura 11).

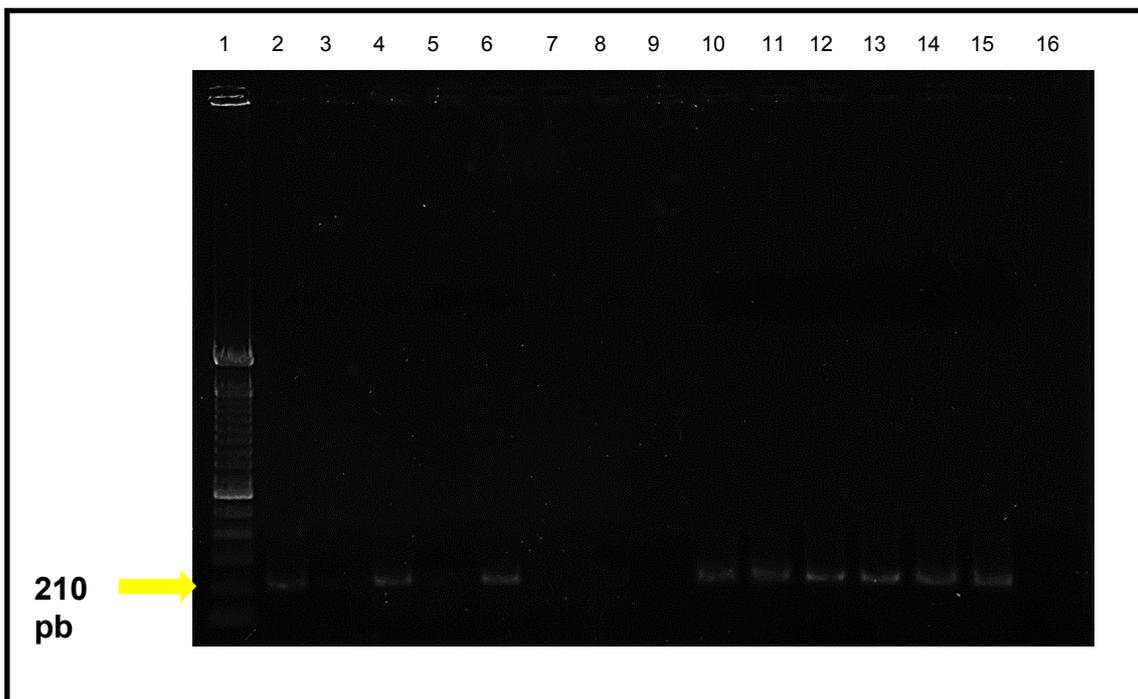


Figura 11– Padrão de bandas positivas para *H. capsulatum* em gel de agarose a 1% após eletroforese, sendo as amostras 2, 4, 6, 10, 11, 12, 13 e 14 positivas, 15 – Controle positivo e 16 – Controle negativo.

Quando a técnica de diagnóstico molecular baseado em PCR em tempo real (qPCR Multiplex) foi realizada nas nossas amostras, a qPCR multiplex apresentou onze amostras positivas para *H. capsulatum* (Amostras 5,18,24,25,27,32,33,34,35,38,40), somente uma para *P. jirovecii* (Amostra 9) e duas amostras para *C. neoformans* (18, 24), sendo que as duas amostras positivas para *C. neoformans* apresentaram co-infecção com *Histoplasma capsulatum*. Cabe salientar que todas as amostras positivas para *H. capsulatum* e *P. jirovecii* neste teste, também foram positivas na *nested* PCR para *H. capsulatum* ou *P.jirovecii*.

A sensibilidade da *nested* PCR foi avaliada no modelo *H. capsulatum* onde se utilizou 5 amostras clínicas estocadas em nosso laboratório e micologicamente comprovadas, com crescimento de *H. capsulatum* em cultura. Todas, e mais os controles positivo e negativo, foram submetidas à *nested* PCR com *primers* de *H. capsulatum*, com a finalidade de detecção do DNA do fungo, com amplificação de uma banda de 210pb, após a realização da técnica

e observação dos resultados eletroforese em gel de agarose, observou-se que as amostras que tiveram crescimento em cultura, também apresentaram banda específica (Figura 12).

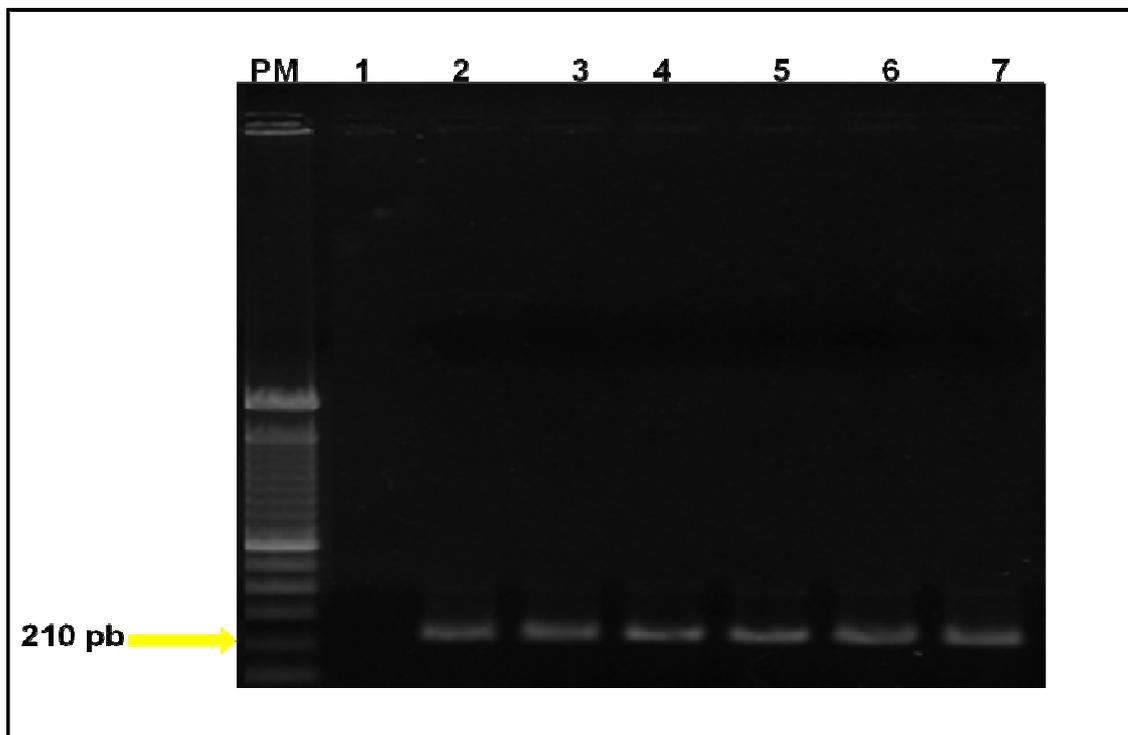


Figura 12 – Reação de *nested* PCR com *primers* de *H. capsulatum* utilizados com DNA extraídos de amostras positivas em cultura. PM – peso molecular, 1 – Controle negativo, 2 ao 6 – amostras positivas em cultura e positivas na PCR e 7= controle positivo

7.4 - CORRELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS LABORATORIAIS

Os resultados do presente estudo mostram uma correlação parcial entre os dados observados pela IFD e *nested* PCR para *P. jirovecii*, onde o teste molecular detectou doze amostras positivas entre as quarenta estudadas (30%) e a IFD detectou a presença do fungo em seis amostras (15%), sendo as amostras 6, 7, 8, 9, 16, 18, 19, 21, 33, 34, 35 e 38 e as amostras 9, 16, 18, 19, 34, 35) positivas na *nested* PCR e na IFD respectivamente. Isso mostrou que o teste molecular exerceu uma vantagem sobre a IFD, quando comparada a quantidade isolada de amostras positivas em cada teste, pois as amostras que

foram positivas na IFD, também foram na *nested* PCR para *P. jirovecii*, não ocorrendo o inverso (Apêndice A).

Não foi possível fazer uma comparação fiel entre as técnicas de coloração, os imunoenaios, o cultivo e as técnicas moleculares devido a adequabilidade das amostras clínicas empregadas no estudo, sugerindo que o fato de algumas amostras serem paucicelulares e muitas apresentarem crescimento de fungos do gênero *Candida*, possa ter comprometido o crescimento em cultura.

Quando comparamos duas técnicas moleculares para detecção de *P. jirovecii*, a *nested* PCR e qPCR multiplex, observou-se que a *nested* PCR também se mostrou mais vantajosa quando comparada com a qPCR multiplex, detectando sequencia específica em doze espécimes clínicos (amostras 6, 7, 8, 9, 16, 18, 19, 21,33,34, 35 e 38) e a qPCR Multiplex detectou a presença do DNA de *P. jirovecii* apenas em uma amostra (9), amostra essa que também foi positiva na *nested* PCR (Apêndice A).

Já a comparação entre a *nested* PCR e qPCR multiplex para a detecção de *H. capsulatum*, demonstrou vinte nove amostras positivas na *nested* PCR (Apêndice A) e onze na qPCR (amostras 5, 18, 19, 24, 25, 27, 32, 33, 34, 35, 38) sendo que as onze amostras positivas na qPCR multiplex também foram positivas na *nested* PCR, mostrando assim, uma maior expressividade dos resultados obtidos na *nested* PCR.

Algumas infecções mistas foram evidenciadas pelos métodos laboratoriais empregados neste estudo. Um exemplo é a amostra 35, que foi positiva para *H. capsulatum* na coloração pela Prata metanamina, na qPCR Multiplex e na *nested* PCR, sendo também positiva para *P. jirovecii* tanto na *nested* PCR quanto na imunofluorescência direta, porém esse é um caso onde o diagnóstico não pode ser concluído, pois no caso de *H. capsulatum*, não houve crescimento do fungo em cultura, resultado também encontrado em outras 8 amostras (6, 7, 8, 18, 19, 33, 34, 38), onde foi detectada a presença de DNA de *P. jirovecii* e de *H. capsulatum* pela *nested* PCR, sendo também detectado DNA de *H. capsulatum* nas amostras (18, 19, 33, 34 e 38) pela qPCR Multiplex.

Ainda se tratando de co-infecções, a amostra de número 19, foi positiva para *P. jirovecii* pela Imunofluorescência direta e pela *nested* PCR, sendo também positiva na qPCR Multiplex para *C. neoformans*, o qual também foi isolado em cultivo, mostrando assim, mais um paciente sendo acometido por duas espécies fúngicas.

7.5 - CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL

Como as técnicas de IFD e *nested* PCR foram as únicas que apresentaram positividade significativa para *P. jirovecii*, realizamos a correlação clínico-laboratorial somente nessas duas técnicas. Na técnica de IFD verificou-se que nenhum paciente com probabilidade menor que 23% de PCP foi positivo nesta técnica. Já no grupo de pacientes com probabilidade maior que 82% verificamos uma positividade de 28,5% e os demais 15 pacientes (71,5%) apresentaram resultado negativo. Desta forma, esta técnica conseguiu distinguir significativamente os dois grupos de pacientes, sendo obtido um P valor de 0,02 através do teste exato de Fisher (Figura 13A).

Quando analisamos a correlação entre os resultados da *nested* PCR e a probabilidade de PCP dos pacientes verificamos que do grupo de pacientes com menos de 23% de probabilidade de PCP um paciente (5%) apresentou positividade nesta técnica, enquanto que os outros 18 pacientes foram todos negativos. Dentre os pacientes com probabilidade maior que 82% para PCP verificamos que 11 pacientes (52%) foram positivos enquanto que dez pacientes (48%) foram negativos. Analisando esses dados verificamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo obtido um P valor de 0,0015 através do teste exato de Fisher (Figura 13B). Cabe salientar que o valor de P menor obtido na *nested* PCR comparado com a IFD indica que a primeira técnica é superior à segunda no diagnóstico da PCP.

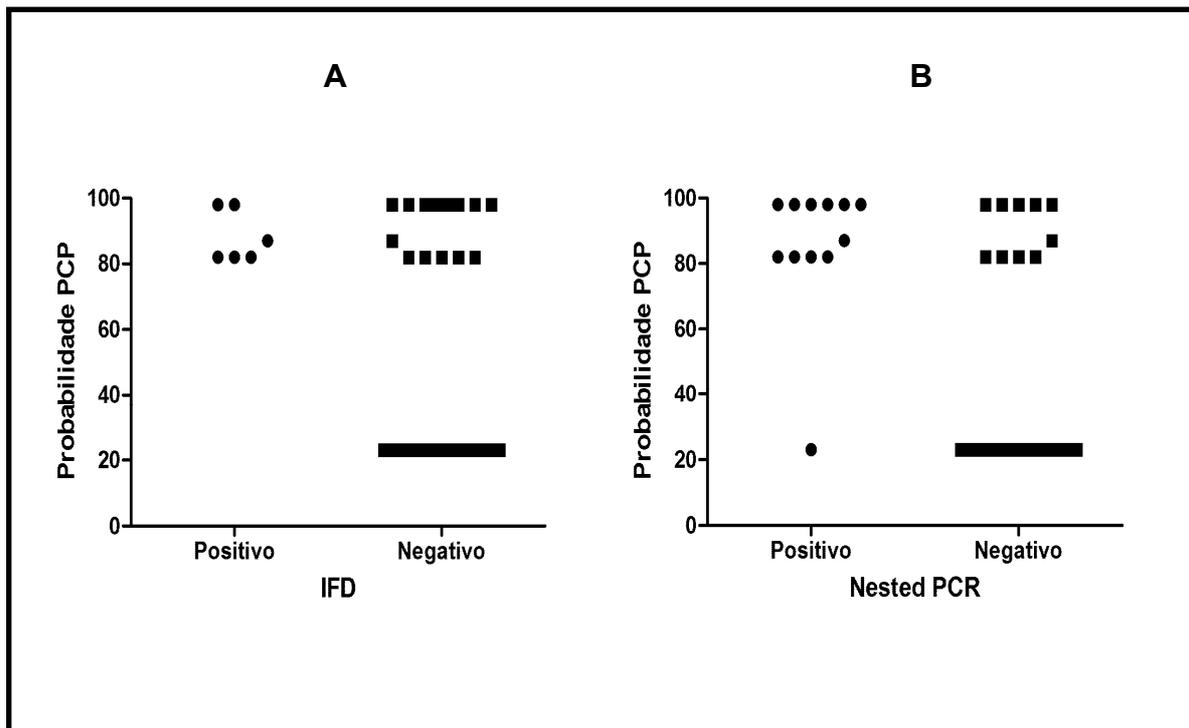


Figura 13 – Detecção de positividade por meio da IFD e *nested* PCR entre os pacientes com variadas probabilidades de PCP.

Os quadros 5 e 6 apresentam os resultados positivos e negativos na *nested* PCR e IFD distribuídos pelos respectivos *scores* dos 40 pacientes.

Quadro 5 – Distribuição dos resultados do teste de Imunofluorescência entre os pacientes que tiveram resultado positivo e negativo em seus respectivos *scores*.

Score dos Pacientes	+	-	Total
98%	2	9	11
87%	1	1	2
82%	3	5	8
23%	0	19	19

Quadro 6 – Distribuição dos resultados da *nested* PCR entre os pacientes que tiveram resultado positivo e negativo em seus respectivos scores.

Score dos Pacientes	+	-	Total
98%	6	5	11
87%	1	1	2
82%	4	4	8
23%	1	18	19

A *nested* PCR detectou presença do DNA de *P. jirovecii* em todos os scores, 23%, 82%, 87% e 98%, enquanto a IFD detectou a presença de *P. jirovecii* apenas nos pacientes que possuíam uma maior probabilidade de ter a doença.

8 - DISCUSSÃO

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o desempenho de métodos laboratoriais no diagnóstico de pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii*. Nossa casuística foi constituída por amostras respiratórias provenientes de quarenta pacientes com aids, com imunossupressão considerável e com sintomas respiratórios compatíveis com os apresentados por doenças de origem fúngica. Baseado nestes dados, a utilização do sistema de pontuação proposto por Smith, Forbes & Gazzard (1992) em quarenta pacientes permitiu prever alta probabilidade em um grupo destes indivíduos estarem com PCP, sugerindo que este sistema deveria ser aplicado em todas as investigações que envolvam pacientes com suspeita de PCP.

O método sugerido como padrão para diagnosticar PCP continua a ser a identificação microscópica de *P. jirovecii* por métodos de visualização, mais especificamente a IFD, por detectar o fungo nos seus dois estágios evolutivos, em amostras respiratórias. No entanto, o desempenho de técnicas de visualização microscópica de *P. jirovecii* é dependente da qualidade do espécime clínico, número de microrganismos e da experiência do investigador (CARMONA *et al.*, 2011). Além disso, estudos destacam a baixa carga de *P.jirovecii* em pacientes imunocomprometidos, não portadores de HIV (THOMAS & LIMPER 2004) e da falta de sensibilidade dos métodos microscópicos (FLORI *et al.*, 2004).

Das 25 amostras em que não houve crescimento fúngico, 12 amostras eram amostras com celularidade escassa e isso pode ter comprometido o resultado. Nas 13 amostras em que houve crescimento de fungos do gênero *Candida*, resultado que confirmou a maioria dos achados na coloração pela Prata, porém, na amostra 35 houve a visualização de estruturas compatíveis com *H. capsulatum*, na coloração pela Prata e amplificação de DNA na *nested* PCR e na qPCR, não havendo crescimento em cultura, porém o fato de crescimento de *Candida* nessa amostra, pode ter dificultado o crescimento de *H.capsulatum*.

A detecção de DNA de *C. neoformans* na amostra 19 pela qPCR foi confirmada em cultura, porém na amostra 24, também foi detectada a presença

de DNA de *C. neoformans* pelo mesmo método, não havendo dessa vez confirmação micológica.

Inúmeros trabalhos comparando os métodos convencionais de diagnóstico vêm demonstrando a baixa sensibilidade destas metodologias. Um estudo mostrou que em uma amostragem de 275 pacientes com PCP, somente nove amostras (3,27%) apresentaram positividade na coloração pela prata e 16 (5,81%) amostras foram positivas pela imunofluorescência direta. Entretanto, quando a *nested* PCR foi avaliada, *P. jirovecii* foi identificado em 44 amostras (16%), mostrando a maior sensibilidade do teste molecular (GUPTA *et al.*, 2009). Embora o nosso estudo tenha uma amostragem menor, nossos dados são similares a este estudo anterior onde foi encontrada uma positividade de 30% em um método molecular, a *nested* PCR, contra 15% nos testes de IFD.

Em outro estudo realizado por El-Seidi e colaboradores (2008), muito similar ao nosso, os pesquisadores utilizaram cinquenta espécimes clínicos, entre estes lavado broncoalveolar, escarro e lavado nasofaríngeo, e foram comparadas três metodologias: coloração pelo Giemsa, imunofluorescência direta e *nested* PCR. Após a realização dos testes, foi observado que uma amostra foi positiva no Giemsa, quatro amostras foram positivas no teste de imunofluorescência direta e o método molecular detectou a presença do DNA de *Pneumocystis spp.* em 36 das 50 amostras submetidas ao estudo, mostrando mais uma vez a superioridade dos testes moleculares quando comparados com testes tradicionais (EL-SEIDI *et al.* 2008).

Autores sugerem que o teste de Calcofluor e a coloração pela Prata oferecem os melhores parâmetros para uso na rotina de um laboratório clínico (PROCOP, 2004), porém, os resultados obtidos neste estudo contrapõem a literatura principalmente no que se refere ao Calcofluor, teste em que todas as amostras foram negativas, pois já foi descrito que a qualidade da amostra pode comprometer o resultado de alguns testes (CARMONA 2011). Possivelmente a qualidade de nossas amostras explique o baixo rendimento do teste no presente estudo. Sabe-se também que lavados bucais e escarro são menos efetivos na obtenção de suficiente número de organismos para serem visualizados com técnicas de coloração (HARRIS *et al.*, 2011).

A análise da coloração por Hematoxilina-Eosina revelou, em sua grande maioria, material com rara ou escassa celularidade (amostra paucicelular), razão pela qual poderia ser explicada a ocorrência de menor positividade nos testes convencionais. Entretanto, metodologias voltadas a ácidos nucleicos cujos protocolos demandem lise celular, precipitação de proteínas e extração de DNA de todas as células presentes nas amostras garantem um maior suporte molecular para o sucesso da detecção de *P. jirovecii* em amostras paucicelulares.

Embora a literatura cite a imunohistoquímica como uma técnica mais sensível e específica quando comparadas com as colorações convencionais (WAZIR 2004), não foram esses os resultados encontrados no presente estudo, onde todas as amostras foram negativas no teste, resultado semelhante ao da coloração pela prata, mostrando assim, não haver superioridade entre os métodos utilizados em estudos prévios quando comparados aos nossos resultados.

Um estudo publicado em 2007 fez uma comparação entre nove metodologias moleculares e mostrou que a *nested* PCR para detecção da mtLSUrRNA foi a reação que apresentou os melhores resultados, tendo a maior positividade dentre as técnicas utilizadas, sendo então a metodologia mais indicada para a detecção de DNA de *Pneumocystis jirovecii* em amostras respiratórias (ROBBERTS, 2007). Mais recentemente, uma PCR simples foi proposta para detecção de *Pneumocystis* spp. (CHABÉ *et al.* 2014) onde a sensibilidade da técnica foi comparável com a da *nested* PCR. Esta publicação foi gerada no final de nosso trabalho e não foi possível a realização desta técnica, mas estudos estão em andamento, na mesma amostragem, para comparação dos resultados e implementação de uma das PCR's no diagnóstico laboratorial do Laboratório de Micologia do INI.

A detecção de *P. jirovecii* em indivíduos que se apresentam sem pneumonia ou com pneumonia de outra etiologia tem sido definida como colonização ou "transporte" (MORRIS & NORRIS, 2012). Em nosso estudo, a diferenciação entre colonização e doença ativa não pode ser avaliada uma vez que a *nested* PCR para *P. jirovecii* é somente qualitativa e não faz diferenciação entre colonização e infecção, fazendo apenas a detecção do

DNA presente nas amostras, sendo assim, indispensável a análise dos dados clínicos dos pacientes.

Na qPCR multiplex, onde todas as amostras foram submetidas, em uma mesma reação para a detecção de DNA de *H. capsulatum*, *C. neoformans* e *P. jirovecii*; 11 amostras foram positivas para *H. capsulatum*, 2 para *C. neoformans* e 1 para *P. jirovecii*. Todos os pacientes apresentavam sintomatologia compatível com infecções fúngicas, como febre, tosse, perda de peso e hepatomegalia, reforçando a hipótese da presença de mais de um fungo, ainda que não haja infecção, pode-se sugerir a detecção de uma colonização. Contudo, o estado imunológico e a região geográfica dos pacientes suportam os resultados achados no estudo, se tornando um dado importante para uma possível conduta clínica nestes pacientes.

A necessidade de uma busca mais intensificada pela inserção de metodologias nos levou a comparar os resultados obtidos na *nested* PCR realizada pelo nosso grupo com métodos mais sensíveis e que poderiam detectar com maior rapidez três dos mais frequentes agentes de pneumonias fúngicas. Para tanto, foi realizada a qPCR multiplex em tempo real utilizando *primers* alvos para *H. capsulatum*, *C. neoformans* e *P. jirovecii* descritos na tabela 3.

Neste estudo, a *nested* PCR apresentou maior positividade que a qPCR multiplex para *P. jirovecii*. Uma possível explicação para estes resultados seriam os genes alvos, já que trabalhamos na *nested* PCR com o gene mtLSUrRNA com múltiplas cópias por célula por se tratar de um alvo mitocondrial e *P. jirovecii* possuir múltiplas mitocôndrias (GUPTA et al., 2009), provendo assim alvos abundantes, diferente de técnicas que possuem como alvo a região ITS. Diferentemente da maioria dos organismos eucariotos, *P. jirovecii* possui apenas uma cópia do gene que codifica o RNA ribossomal, sendo uma das principais razões pela qual as técnicas que têm como alvo a região ITS de *P. jirovecii* possuem um baixo rendimento (GUPTA et al., 2009). Entretanto, a *nested* PCR e a qPCR Multiplex não diferenciam colonização de infecção e a hipótese de detecção de uma colonização não pode ser descartada.

A presença de co-infecção com outras micoses sugerida por nós é uma hipótese extremamente válida uma vez que a população inserida no estudo foi de indivíduos imunodeprimidos e consequentemente sujeitos à várias patologias ao mesmo tempo.

A co-infecção entre *H. capsulatum* e *P. jirovecii* já foi descrita em morcegos, em um estudo que analisou fragmentos de pulmão de 122 mamíferos, os pesquisadores encontraram, após amplificação por *nested* PCR, DNA de *H. capsulatum* em 98 morcegos, DNA de *Pneumocystis spp.* em 51 morcegos e 43 morcegos estavam co-infectados com os dois microrganismos (GONZÁLEZ-GONZÁLES, *et al.*, 2014).

O primeiro relato humano conhecido de co-infecção entre *H. capsulatum* e *P. jirovecii* aconteceu com uma criança de oito anos do sexo masculino, o paciente era portador da doença de Chron e fazia uso de INFLIXIMAB, um anticorpo monoclonal usado no bloqueio do Fator de Necrose Tumoral (TNF α) e tratamento da doença de Crohn. Após a realização de exames laboratoriais, foi observada a presença de *P. jirovecii* na coloração pela prata metanamina e crescimento de *H. capsulatum* em cultura, sendo um dado importante para os nossos achados, pois os pacientes do estudo possuem elevado grau de imunocomprometimento e residem em área endêmica de histoplasmose, viabilizando a possibilidade de detecção do material genético de ambos os microrganismos (JAMES & SONIA 2010). Posteriormente, Gal e colaboradores (2013) também demonstraram concomitância das duas doenças em paciente com aids. Também já foi demonstrada a associação de PCP com criptococose (JAVIER *et al.*, 2012), com tuberculose (NOWASEB *et al.*, 2014; SUK *et al.*, 2014) e com outras DIP's (BAVA *et al.*, 2011; ANONYMOUS, 2013). Portanto, a associação de *P. jirovecii* com outros fungos era esperada e os métodos moleculares utilizados em nosso estudo foram sensíveis o suficiente para a detecção dessas coinfeções.

O fato da *nested* PCR apresentar melhores resultados na detecção de DNA de *P. jirovecii* já foi discutido, em um estudo que mostrou que o alvo para o qual a *nested* PCR foi desenvolvida é o que faz toda diferença, pois a mtLSUrRNA está totalmente envolvida com processos metabólicos básicos, além de ter possuir um alto grau de conservação genética (BEARD 2000) e o

fato de *P. jirovecii* possuir diversas mitocôndrias em suas células, faz com que a sensibilidade da *nested* PCR seja aumentada, tornando-se assim, o alvo molecular mais indicado para a detecção de *P. jirovecii*. Esse fato demonstra que a sensibilidade dessa metodologia esteja em torno da sequência do gene alvo utilizado. Sendo assim, sugere-se que a *nested* PCR voltada para a mtLSUrRNA seja uma excelente ferramenta para detecção precoce de pneumonia causada por *P. jirovecii*, resultando em menores complicações por parte dos pacientes (SING *et al.*, 1999) e sendo o método mais indicado quando comparado o custo-benefício entre as metodologias, pois o custo mais elevado que as outras metodologias, é totalmente suprido por sua elevada sensibilidade e especificidade (HARRIS 2011). Estes dados também foram corroborados pela correlação clínico laboratorial onde se observou que a *nested* PCR é a mais apropriada para utilização no diagnóstico da PCP.

9 - CONCLUSÕES

- ✓ A *nested* PCR mostrou maior sensibilidade como método diagnóstico de pneumonia por *P. jirovecii*. Entretanto, não difere colonização de doença em atividade; necessitando da correlação de dados clínicos com critérios bem definidos.
- ✓ A substituição da Imunofluorescência direta pela *nested* PCR é uma grande combinação para o diagnóstico da PCP.
- ✓ O teste de calcofluor apresentou a menor sensibilidade neste estudo; o que remete à necessidade de um processo de aprimoramento do protocolo voltado para coleta adequada do espécime biológico e concentração de células de tal material.
- ✓ Os resultados encontrados nesse trabalho corroboram com os dados da literatura, que sugerem que os métodos moleculares oferecem uma maior sensibilidade quando comparados com métodos diagnósticos tradicionais.
- ✓ O uso combinado de metodologias é importante para detectar a presença de um ou mais fungos que possam estar agindo associadamente e assim ajudar no esclarecimento do diagnóstico de pneumonias fúngicas.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adenis AA, Aznar C, Couppie P. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. *Curr Trop Med Rep*. 2014; 1: 119-128.

Agostini F, Atzori C, Angeli E, Mainini A, Micheli V, Cargnel A. *Pneumocystis carinii* diagnosis: an update. *Intern J of antimicrob agents*. 2000; 16: 549-557.

Althoff KN, Gange SJ, Klein MB, Brooks JT, Hogg RS, Bosch RJ, *et al*. Late presentation for human immunodeficiency virus care in the United States and Canada. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 1512-1520.

An CL, Giglioti F, Harmsen AG. Exposure of immunocompetent adult mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* by cohousing: growth of *P. carinii* f. sp. *muris* and host immune response. *Infect Immun* 2003; 71:2065-2070.

Anonymous. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. The *Pneumocystis* Workshop. *J Eukaryot Microbiol* 1994; 41:121S-122S.

Anonymous. Co-infection; new battlegrounds in HIV/AIDS. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:559.

Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients. *Acta Cytol* 1995; 39:1089-1093.

Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, Lundgren, B. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1729-1735.

Benavides DO. Infección pulmonary por *Pneumocystis carinii*: microorganismo, anatomía patológica y diagnóstico. Boletín de la Escuela de Medicina 1991; 20: 56-59.

Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, Michael PF, Sheppard D, Hadley WK, Hopewell PC. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome, Amer Rev of Resp Dis 1986. 133: 515–518.

Bille-Hansen V, Jorsal SE, Henriksen SA, Settnes OP. *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Danish piglets. The Veterinary Record 1990. 20: 407-408.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. Sci Transl Med. 2012; 4:1-9

Botterel F, Cabaret O, Foulet F, Cordonnier C, Costa JM, Bretagne S. Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. J Clin Microbiol 2012; 50: 227–231

Bueno-Fischer G, Mocelin H, Severo CB, Oliveira FM, Xavier MO, Severo LC. Histoplasmosis in children. Pediatr. Respir. Rev 2009; 10:172–177.

Caliendo AM, Hewitt PL, Allega JM, Keen A, Ruoff KL, Ferraro MJ. Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:979-982.

Carini A. Formas des eschizogonia do *Trypanosoma lewiski*. Soc Médico-Cirurgica de São Paulo 1910; 38.

Carmona EM, Limper AH Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis pneumonia*. Ther Adv Respir Dis 2011 5:41–59

Casanova-Cardiel LJ, Cedillo-Rivera R, Garduño-Rodríguez G, Muñoz O. Comparación de dos tinciones en la detección de *Pneumocystis carinii*. La Rev de Invest Clín 1996. 48: 443-447.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR 1992. 41: 1– 19.

Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. J Eukaryot Microbiol 1997; 44:28S.

Chagas C. Nova tripanozomíase 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 Osw Cruz 1909; 1:159-218.

Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJF, Derouin F, Totet A. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* Pneumonia. Clin Infect Dis 2010; 51:259-265.

Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 1 ed. Guanabara Koogan, 2005, v2:1253-1256.

Cushion MT, Ruffolo JJ, Walzer PD. Analysis of the developmental stage of *Pneumocystis carinii*, in vitro. Lab Invest 1988; 58(3):324-331.

Curry A, Turner AJ, Lucas S. Opportunistic protozoan infections in immunodeficiency virus disease: Review highlighting diagnostic and therapeutic aspects. J Clin Path 1991; 44:182-183.

Dei-Cas E. *Pneumocystis infection*: the iceberg? Med Mycol 2000; 38: 23-32.

Delanoe P, Delanoe M. Sur les rapports dès kistes de Carini du poumon des rats avec *Trypanosoma lewiski*. Compens rendues de l'Academie des Sciences 1912; 66:658-661.

Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, Guillot J. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. J Clin Microbiol 2001; 39: 2126-2133.

Denis CM, Cailiez JC, Aliouat EM, Delcourt P, LePage G, Hermant N, Lamouret M, Dei- Cas E. Does *Pneumocystis carinii* remain infectious in the bloodstream? J Eukaryot Microbiol 1994; 41: 86S.

Edman JC, Kovacs JÁ, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature 1988; 334:519-522.

Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. FEMS Immunol MedMicrobiol 2005, 45:405–410.

El Seidi EA, El-Hodaky, SK, Ouda NH, Meshref M, El-Bassiouny SO, El-Masry MK, El-Din HG. Comparision of different methods to diagnose *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in children with haematological malignances. Egyptian J of Med Microbiol 2008; 17: 151-159.

Elvin KM, Bjorkman A, Linder E, Heurlin N, Hjerpe A. *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. Brit Med J 1988; 297: 381-384.

Erikson OE. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). System Ascomycetum 1994; 13: 165-80.

Feldman RE. *Pneumocystis carinii*, hoy. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1992. XXVI: 79-84.

Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, Lucht F, Sung RT. Comparison between realtime PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 2004 53:603–607

Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Wu YP, Zhou L, Gupta A, Rudney H, Kaneshiro ES. Occurrence of specific sterols in *Pneumocystis carinii*. Biochem Biophys Res Commun 1994; 198:236-242.

Fonzi WA, Ypma-Wong Sypherd PS. Fungus-specific translation of elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. Infect Immun 1992; 60: 4140-4145.

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

Gal SL, Damiani C, Virmaux M, Schmit JL, Totet A, Nevez G. A 39-Year-Old Man with human immunodeficiency virus infection presenting with an alveolo-interstitial pulmonary syndrome. J Clin Microbiol 2013; 51: 2809

Galanis E, MacDougall L, Kidd S, Morshed M, British Columbia Cryptococcus gattii Working Group. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. Emerg. Infect. Dis 2010

Gazzoni AF, Severo CB, Salles EF, Severo LC. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2009; 51:255–259.

Gigliotti F. Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1992; 165:329-336.

Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, Haidaris PJ. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. Infect Immun 1993; 61:2886-2890.

Giuntoli DS, Stringer L, Stringer Jr. Extraordinarily low number of ribosomal RNA genes in *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol 1994; 41: 88S.

Global Health Council. The impact of infectious diseases. 2011 [Acessado em 20 out. 2012]. Disponível em: www.globalhealth.org/infectious_diseases/)

Gosey LL, Howard RM, Wytebsky FG, Ognibene FP, Wu TC, Gill VE, Maclowry JD. Advantages of a modified Toluidine Blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. J of Clin Microbiol 1985; 22: 803-807.

Grangeiro A, Escuder MM, Menezes PR, Alencar R, Ayres de Castilho E. Late entry into HIV care: estimated impact on AIDS mortality rates in Brazil, 2003-2006. PLoS One. 2011; 6: 1-11.

Griffin AT, Hanson KE. Update on fungal diagnostics. Curr Infect Dis Rep 2014; 16: 415.

Gupta N, Arora SK, Rajwanshi A, Nijhawan R, Srinivasan R. Histoplasmosis: cytodagnosis and review of literature with special emphasis on differential diagnosis on cytomorphology. Cytopathol 2009; 21: 240-244.

Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Kumar L, Samataray JC, Agarwal SK, Kabra SK, Luthra K. Diagnostic significance of nested polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64: 381-388.

Harris JR, Marston BJ, Sangrue N, DuPlessis, Park B. Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for *Pneumocystis* pneumonias (PCP). PlosOne 2011; 6:e23158.

Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, Rabodonirina M. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. Clin Infect Dis 2010; 51: 28-33.

Hay JW, Osmond DH, Jacobson MA. Projecting the medical costs of AIDS and ARC in the United States. J Acquir Immune Defic Syndr 1988; 1: 466-485.

Helweg-Larsen J, Tsolaki AG, Miller RF, Lundgren B, Wakefield AE. Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. Q J Med 1998; 91:813-820.

Huang L, Stansell JD. AIDS and the lung. Med Clin North Am 1996; 80:775-801.

Hughes WT & Anderson DC. *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Lower respiratory tract infections. 1991; 289-296.

Hughes WT. *Pneumocystis carinii* vs. *Pneumocystis jirovecii*: another misnomer, Emerg Infect Dis. 2003 9: 276-277.

Hughes WT. Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1982; 145:842-848.

Huston SM & Mody CH. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. Clin Chest Med 2009; 30:253–264.

Israel HL, Gottlieb JE, Schulman ES. Hypoxemia with normal chest roentgenogram due to *Pneumocystis carinii* pneumonia. Diagnostic errors due to low suspicion of AIDS. Chest 1997; 92:857-859.

Jannik-Helweg-Larsen. *Pneumocystis jirovecii*: applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. Danish Medical Bulletin 2004; 51.3.

Javier B, Susana L, Santiago G, Alcides T. Pulmonary coinfection by *Pneumocystis jirovecii* and *Cryptococcus neoformans*. Asian Pac Trop Biomed 2012; 2 (1): 80-82.

Jirovec O. *Pneumocystis carinii*, the cause of interstitial plasmocellular pneumonia in neonates. P Csl Hyg Epid Mikrob 1952; 141.

Jensen TK, Boye M, Bille-Hansen. Application of fluorescent in situ hybridization for specific diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals and pigs. Vet Pathol 2001; 38: 269-274.

Kaneshiron ES, Ellis JE, Jayasimhulom K, Beach DH. Evidence for the presence of "metabolic sterols in *Pneumocystis*: identification and initial characterization of *Pneumocystis carinii* sterols. J Eukaryot Microbiol 1994; 41:78-85.

Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H, *et al.* Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep. 2009; 58: 1-207.

Kauffman CA. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. Cur Opin Infect Dis 2008; 21:421-425.

Kauffman CA. Histoplasmosis. Clin Chest Med 2009; 30:217-225.

Kondo H, Hikita M, Kadota K. Immunohistochemical study of *Pneumocystis carinii* infection in pigs: evaluation of *Pneumocystis* pneumonia and a retrospective investigation. *Vet Rec* 2000; 147: 544-549.

Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung G, Hadley WK, Evans G. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1988; 318: 589-593.

Kurokawa T, Kaya H, Yoshida T. Two cases of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia with Non-Hodgkin's Lymphoma after CHOP based chemotherapy containing rituximab. *J Clin Exp Hematopathol* 2010; 50: 159-162

Lamoth F, Alexander BD. Nonmolecular methods for the diagnosis of respiratory fungal infections. *Clin Lab Med* 2014; 34: 315-336.

Latouche S, Poirot JL, Maury E, Bertrand V, Roux P. *Pneumocystis carinii* hominis sequencing to study hypothetical person-to-person transmission. *AIDS* 1997; 11:549.

Latourneau AR, Issa NC, Baden LR. Pneumonia in the immunocompromised host. *Curr Opin Pulm Med* 2014; 20: 272-279.

Lee CH, Lu JJ, Tang X, Jiang B, Li B, Jin S et al. Prevalence of various *Pneumocystis carinii* sp. f. hominis types in different geographical locations. *J Eukaryot Microbiol.* 1996; 43: (5):37S.

Leigh TR, Gazzard BG, Rowbottom A, Collins JV. Quantitative and qualitative comparison of DNA amplification by PCR with immunofluorescence staining for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Pathol.* 1993; 46:140-144.

Lyn TY, Yeh KM, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY. Cryptococcal disease in patients with or without human immunodeficiency virus: clinical presentation

and monitoring of serum cryptococcal antigen titers. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42: 220–226.

Matsumoto Y, Yoshida Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear division observed in precysts. *J Protozool* 1984; 31:420-428.

Merali S, Vargas D, Franklin M, Clarkson AB Jr. S-adenosylmethionine and *Pneumocystis carinii*. *J Biol Chem* 2000; 275:14958-14963.

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico - AIDS e DST. Brasília, D.F., 2014.

Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 297-317.

Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PH, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1713–1720.

Muñoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobón A, Cano LE, Gonzales A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72: 204-213.

Murray JF, Mills J. Pulmonary infectious complications of human immunodeficiency virus infection. *The Amer rev of resp dis* 1990; 141: 1582 – 1598.

Naggie S & Perfect JR. Molds: hyalohyphomycosis, phaeohyphomycosis and zygomycosis. *Clin Chest Med*. 2009; 30: 337–353.

Navin TR, Rimland D, Lennox JL, Jernigan J, Cetron M, Hightower A, Roberts JM, Kaplan JE. Risk factors for community-acquired pneumonia among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000; 181:158-164.

Nielsen J, Bille-Hansen V, Settnes OP. Experimental corticosteroid induction of *Pneumocystis carinii* pneumonia in piglets. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scan* 1999; 107: 921–928.

Nimri LF, Moura IN, Huang L, del Rio C, Rimland D, Duchin JS, Dotson EM, Beard CB. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1146-1151.

Nowaseb V, Gaeb E, Fraczek MG, Richardson MD, Denning DW. Frequency of *Pneumocystis jirovecii* in sputum from HIV and TB patients in Namibia. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(3): 249-357.

Oddó DB, *Pneumocystis carinii*, conceptos básicos y patomorfología. *Revista Chilena de Infectología* 1990. 7; 65–79.

Olsson M, Lidman C, Latouche S, Bjorkman A, Roux P, Linder E, Wahlgren M.. Identification of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *J. Clin Microbiol* 1998 36: 1737-1740.

Oz HS, Hugh WT, Vargas SL. Search for extrapulmonary *Pneumocystis carinii* in an animal model. *J Parasitol* 1996; 82: 357-359.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009; 23: 525-530.

Park CS, Kang CL, Chung DR, Peck KR, Kim WS, Kim SJ. Clinical Significance of Non-neutropenic Fever in the Management of Diffuse Large B-Cell

Lymphoma Patients Treated with Rituximab-CHOP: Comparison with Febrile Neutropenia and Risk Factor Analysis. *Canc Res Treat* 2014;

Perez Mato S, Van Dyke RB. Pulmonary infections in children with HIV infection. *Semin Respir Infect* 2002; 17:33-46.

Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, Woods D. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunocompromised children. *Pediatrics* 1978, 61:35-41.

Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 1991; 5: 1347-1351

Pottratz ST, Paulsrud J, Smith JS, Martin WJ. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp120, a fibronectin binding protein. *J Clin Invest* 1991; 88:403-407.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Osw Cruz* 2009; 104: 513-521

Raab SS, Cheville JC, Bottles K, Cohen MB. Utility of gomori methenamine silver stains in bronchoalveolar lavages. *Modern Pathology* 1994. 7: 599–614.

Readhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, String JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *J. Eukariot Microbiol* 2006; 53:2-11.

Ramalho J, Barcelar Marques ID, Aguirre AR, Pierrotti LC, Paula FJ, Nahas WC, David-Neto E. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with an atypical granulomatous response after kidney transplantation. *Transp Infect Dis* 2014; 16: 315-319.

Rosen MJ. Pneumonia in patients with HIV infection. *Med Clin North America*. 1994; 78: 1067.

Saubolle MA. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Ann NY Acad Sci*. 2007; 1111: 301-314.

Schildgen V, Mai S, Khalfaoul S, Lusebrink J, Pieper M, Tilimann R L, Brockmann M, Schildgen O. *Pneumocystis jirovecii* can be productively Cultured in Differentiated CuFi-8 airway cells. *mBIO* 2014, 5: 1-10.

Schuh JC, Harrington KA, Fanslow WC. Terminology changes needed for descriptions of *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 1997; 65(3):175-182.

Settnes OP, Henriksen AA. *Pneumocystis carinii* in large domestic animals in Denmark. A preliminary report. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1989. 30: 437-440.

Shelhamer JH, Gill VJ, Quinn TC, Crawford SW, Kovacs JA, Masur H, Ognibene FP. The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections. *Ann Intern Med* 1996; 124:585-599.

Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3409-3410.

Souza W, Benchimol M. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: A mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 8:903-908.

Smith D, Forbes A, Gazzard B. A single scoring system to diagnose *Pneumocystis carinii* pneumonia in high-risk individuals. *AIDS* 1992; 6: 337-338.

Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis carinii*: Sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol* 1989; 68:450-461.

Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly? *Clin Microbiol Rev* 1996; 489-498.

Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:891-896.

Suk CW, Bai KJ, Yu MC, Hu TY. Coinfection of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and pulmonary tuberculosis in a non-HIV infected patient. *J of Microbiol, Immunol and Infect* 2014; xx 1-2

Thomas CF Jr, Limper AH (2004) *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med* 2004; 350:2487–2498.

Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nature Rev Microbiol* 2007; 5: 298-308.

Tiley SM, Marriot DJE, Harkness JL. An evaluation of four methods for the detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens. *Pathol* 1994. 26: 325–328.

Tschudy J, Michail S. Disseminated Histoplasmosis and *Pneumocystis pneumonia* in a child with Crohn disease receiving infliximab. *J Pediatric gastroenterol Nutr* 2010; 51:221-222

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

Vanek J. Atypická (interstiální) pneumonie dětí vyvolaná *Pneumocystis carinii* (Atypical interstitial pneumonia of infants produced by *Pneumocystis carinii*). Casopis lékařů České republiky 1951; 1121-1124.

Walzer PD, Melnick TC. Pneumocystis Pneumonia. 3ed. Marcel Dekker, 2005, 194: 100.

Walzer PD, Schnelle V, Armstrong D, Rosen PP. Nude mouse: a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. Science 1977; 4299:177-179.

Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM. Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. Mol Biochem Parasitol 1990; 43:69-76.

Wakefield AE. Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. J Eukaryot Microbiol 1994; 41:116S.

Wakefield AE. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 22:5-13.

Wazir JF, Macrorie SG, Coleman DV. Evaluation of sensitivity, specificity and predictive value of monoclonal antibody 3F6 for the detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia in bronchoalveolar lavage and induced sputum specimens. Cytopathology 1994; 5:82-90.

Wazir JF, Ansari NA. *Pneumocystis carinii* infection. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2004; 128: 1023-1027.

Wharton JM, Coleman DL, Wofsy CB, Luce JM, Blumenfeld W, Hadley WK, et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole or pentamidine for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A prospective randomized trial. Ann Intern Medicine. 1986; 105: 37-44.

Wiley EO. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst Zool* 1978; 27:17-26.

Witebsky FG, Andrews JDW, Gill VJ, Maclowry JD. Modified Toluidine Blue O stain for *Pneumocystis carinii*: further evaluation of some technical factors. *J of Clin Microbiol* 1988. 26: 774–775.

World Health Organization. Joint WHO/UNAIDS/UNICEF. 2004. Statement on use of cotrimoxazole as prophylaxis in HIV-infected children. Geneva (Switzerland): WHO.

Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1992; 60:4140-4145.

APÊNDICES

Resultados

No.	Esp	CD4	CV	IFD	PCR β - Globina	nested PCR Pj	nested PCR Hc	qPCR mult	IHQ	Calco	Prata	H&E	Cultura
1	LT	51	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo para Fungos	<i>Pneumocystis</i> e <i>Candida</i> ?	<i>Candida</i> spp
2	LT	51	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Positivo para Fungos	Neutrófilos	NHCF
3	LT	51	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo	Células Inflamatórias	NHCF
4	LT	189	<40	0	1	0	1	NHA	0	0	Positivo para <i>Candida</i> spp	Amostra acelular	<i>Candida</i> spp
5	LT	110	544.934	0	1	0	1	Hc	0	0	não avaliável	Amostra mínima e acelular	NHCF
6	EI	305	2.427.730	0	1	1	1	NHA	0	0	Positivo para <i>Candida</i> spp	Célula escamosa	<i>Candida</i> spp
7	LT	7	116.689	0	1	1	1	NHA	0	0	Negativo	Negativo	<i>Candida</i> spp
8	EI	112	850.578	0	1	1	1	NHA	0	0	Negativo	Poucas células escamosas	NHCF
9	EI	8	350.638	1	1	1	0	Pj	0	0	Amostra acelular	Amostra acelular	NHCF

Resultados

No.	Esp	CD4	CV	IFD	PCR β -Globina	nested PCR Pj	nested PCR Hc	qPCR mult	IHQ	Calco	Prata	H&E	Cultura
10	EI	200	10.745	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo	Células cilíndricas e escamosas, neutrófilos	NHCF
11	EI	308	NI	0	1	0	0	NHA	0	0	Positivo para Fungos	Células escamosas	NHCF
12	EI	43	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo	Raras células escamosas sem células cilíndricas	NHCF
13	EI	62	NI	0	1	0	0	NHA	0	0	Positivo para Fungos <i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp	Células escamosas	<i>Candida</i> spp
14	EI	70	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Positivo para fungos, compatível com <i>Pneumocystis</i>	Amostra acelular	NHCF
15	EI	64	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo	Célula escamosa	NHCF
16	EE	60	Ni	1	1	1	0	NHA	0	0	Negativo	Material Paucicelular	NHCF
17	LBA	402	333.849	0	1	0	1	NHA	0	0	Positivo para fungos negativo para <i>P.j</i>	Paucicelular raras células escamosas	<i>Candida</i> spp

Resultados

No.	Esp	CD4	CV	IFD	PCR β-Globina	nested PCR Pj	nested PCR Hc	qPCR mult	IHQ	Calco	Prata	H&E	Cultura
18	EI	32	177.036	1	1	1	1	Hc	0	0	Positivo para Candida negativo para P.j	Célula escamosa	<i>Candida</i> spp
19	EI	39	NI	1	1	1	1	Hc – Cn	0	0	Positivo para Candida/Cn	Células escamosas superficiais	<i>Candida</i> spp <i>C. neoformans</i>
20	LT	469	48	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo	Neutrófilos e macrófagos	NHCF
21	EI	42	Ni	0	1	1	0	NHA	0	0	Positivo para fungos Negativo para P.j	Neutrófilo	<i>Candida</i> spp
22	EI	46	<40	0	1	0	0	NHA	0	0	Bactéria filamentosa. Fungo?	Célula escamosa, neutrófilo	NHCF
23	EI	68	4.740	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo	Material paucicelular	<i>C. neoformans</i>
24	EI	70	NI	0	1	0	1	Hc – Cn	0	0	Cryptococcus	Célula escamosa, bactéria	NHCF
25	LT	67	NI	0	1	0	1	Hc	0	0	Levedura, provável <i>Cryptococcus</i>	Material paucicelular, neutrófilos mononucleares	NHCF
26	EI	98	45.904	0	1	0	1	NHA	0	0	Fungo compatível com <i>Candida</i>	Células escamosas, Inflamatórias e neutrófilos	<i>Candida</i> spp

Resultados

No.	Esp	CD4	CV	IFD	PCR β -Globina	nested PCR Pj	nested PCR Hc	qPCR mult	IHQ	Calco	Prata	H&E	Cultura
27	EI	92	NI	0	1	0	1	Hc	0	0	Hifas	Célula escamosa, bactéria filamentosa e polimorfos nucleares	NHCF
28	LBA	39	3.193	0	1	0	0	NHA	0	0	Hifa e levedura	Células escamosas	NHCF
29	LT	48	5.002	0	1	0	0	NHA	0	0	Negativo	Células cilíndricas	NHCF
30	EE	130	25.940	0	1	0	0	NHA	0	0	<i>Candida</i>	Polimorfo nuclear, célula Cilíndrica e célula escamosa	<i>Candida</i> spp
31	EE	86	580.521	0	1	0	0	NHA	0	0	Negativo	Neutrófilo, células escamosa e bactéria	NHCF
32	EI	35	NI	0	1	0	1	Hc	0	0	Bac filamentosa, negativo para fungos	Célula escamosa, neutrófilo, célula cilíndrica e bactéria	<i>Candida</i> spp
33	LBA	238	1.628	0	1	1	1	Hc	0	0	Amostra paucicelular	Células degeneradas, macrófagos?	<i>Candida</i> spp
34	LT	111	1.689	1	1	1	1	Hc	0	0	Amostra paucicelular	Material paucicelular	NHCF

Resultados

No.	Esp	CD4	CV	IFD	PCR β -Globina	nested PCR Pj	nested PCR Hc	qPCR mult	IHQ	Calco	Prata	H&E	Cultura
35	EE	0	718.648	1	1	1	1	Hc	0	0	Positivo para <i>H.capsulatum</i>	Células escamosas, tecido vegetal e bactérias	<i>Candida spp</i>
36	EI	64	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Levedura, negativo PCP	Neutrófilo, poucas células escamosas e bactérias	NHCF
37	LBA	128	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Negativo PCP	Célula escamosa, cilíndrica e macrófago alveolar	NHCF
38	LBA	238	1.628	0	1	1	1	Hc	0	0	Hifa e levedura	Paucicelular, células escamosas superficiais	NHCF
39	LT	79	262	0	1	0	0	NHA	0	0	Levedura	Poucos neutrófilos, raras células escamosas	NHCF
40	EI	72	NI	0	1	0	1	NHA	0	0	Levedura	Neutrófilo, célula escamosa	NHCF

Legenda: Esp = Espécime, IFD = Imunofluorescência direta, qPCR Multiplex = PCR quantitativa Multiplex, IHQ = Imunohistoquímica, Calco = Reação de Calcofluor, Prata = Coloração pela Prata Metanamina, H&E = Coloração pela Hematoxilina e Eosina, TCD4+ = Contagem de linfócitos TCD4, CV = Carga Viral, EI = Escarro Induzido, LBA = Lavadobroncoalveolar, LT = Lavado Traqueal, EE = Escarro Espontâneo, NHA = Não Houve Amplificação, NHCF = Não houve crescimento fúngico, 1 = Positivo, 0 = Negativo.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
DE ACORDO COM AS NORMAS DA RESOLUÇÃO Nº 196, DO
CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DE 10 DE OUTUBRO DE 1996

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE MÉTODOS LABORATORIAIS NO
DIAGNÓSTICO DE PNEUMONIA CAUSADA POR *Pneumocystis jirovecii***

Pesquisador Responsável: Rosely Maria Zancopé Oliveira. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365. Telefones (21) 3865-9506 / 3865-9515 – Celular (21) 9989-0843. Laboratório de Micologia 2ª a 6ª feira das 8:00 h às 17:00 h.

A pneumonia causada pelo fungo *Pneumocystis jirovecii* (PCP), é uma importante causa de infecção em pacientes com algum defeito imunológico, principalmente com AIDS e evoluem para quadros pulmonares muito graves podendo ser fatal se não for diagnosticada e tratada rapidamente. Além disso, esta micose pode ser confundida com outras doenças. O diagnóstico da PCP requer especial atenção uma vez que o principal método para detecção de *P. jirovecii*, um organismo que não pode ser cultivado pelas metodologias rotineiramente utilizadas para o cultivo de fungos, é sua visualização em preparações de amostras respiratórias através de técnicas de coloração ou imunoensaios. Entretanto, a sensibilidade dos métodos é dependente do espécime clínico utilizado. Considerando estas dificuldades, nos propomos a avaliar um método molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico da PCO. Os conhecimentos adquiridos possibilitarão condutas clínicas e preventivas mais apuradas, e conseqüentemente os custos dos cuidados médicos foram reduzidos, com um aumento na qualidade de vida dos pacientes afetados por PCP.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que tem como objetivo estudar um método de diagnóstico laboratorial da PCP. Para sua participação neste projeto é necessária somente a coleta de um ou mais dos materiais discriminados a seguir: escarro, escarro induzido, aspirado brônquio-

traqueal, lavado bronco-alveolar, que foram utilizados no estudo proposto. No momento da coleta você poderá sentir um pequeno desconforto (ou dor), o qual em geral passa após o procedimento. Em alguns casos será necessária a intubação oro-traqueal e para tal o paciente será sedado. Estes procedimentos somente foram realizados por indicação médica e não apenas para fins deste estudo.

Como explicado antes, o exame que será realizado com sua amostra biológica serve para verificar se você está com PCP. Caso queira, após a realização dos exames em sua amostra, os seus resultados poderão ser informados a você, porém esses resultados não devem alterar a conduta clínica que os médicos realizarão, ou seja, você não terá que tomar mais ou menos remédios por conta disso.

Sua participação não é obrigatória, mas voluntária. Você pode se recusar a participar da pesquisa ou, a qualquer momento, desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que este fato cause qualquer constrangimento ou penalidade. O pesquisador se obriga a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, e também poderá interromper sua participação a qualquer tempo, por razões técnicas ou médicas quando, então, você receberá aconselhamento e orientação. Os exames e procedimentos aplicados foram gratuitos. Antes de assinar este termo, você deve se informar plenamente sobre ele, fazendo todas as perguntas que ache necessário. Devendo ficar esclarecido (a) quanto às informações que se seguem:

A - Sua participação nessa pesquisa também consistirá em permitir que os seus registros médicos, ou seja, as anotações feitas pelos médicos sejam usadas como fonte de informação para a condução do estudo. As informações obtidas através dessa pesquisa foram confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não foram divulgados de forma a possibilitar sua identificação, seja pelo nome, por fotografias ou características físicas. Os resultados foram divulgados em apresentações ou publicações com fins unicamente científicos ou educativos.

B - Sua participação neste estudo poderá não trazer benefícios diretos para você, mas você estará contribuindo para aumentar os conhecimentos no

diagnóstico e compreensão da PCP, beneficiando no futuro outras pessoas que possam adquirir esta doença.

C - Participar dessa pesquisa não implicará em nenhum custo para você e, como voluntário, você não receberá qualquer valor em dinheiro como compensação pela participação, pois essa pesquisa não irá gerar lucro financeiro para nenhum dos envolvidos.

D - Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço da pesquisadora responsável, podendo tirar dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou em qualquer momento.

ANEXO II

TERMO DE COMPROMISSO

INSTITUIÇÃO: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) – Fiocruz

COORDENADOR DA PESQUISA: Rosely Maria Zancopé Oliveira,
Pesquisador Titular do IPEC-FIOCRUZ

EXECUTOR DO PROJETO: Fernando Almeida da Silva, Biólogo do IPEC-FIOCRUZ

ENDEREÇO: Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – Rio de Janeiro – CEP 21045-900
Tel.: (0xx21) 3865-9557 Fax (0xx21) 3865-9557 e-mail:rosely.zancope@ipec.fiocruz.br

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação do desempenho de métodos laboratoriais no diagnóstico de pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii*

Infecções fúngicas tem sido uma grande ameaça nas últimas décadas para a população em geral, e especialmente para os indivíduos com comprometimento em seu sistema imune. Um dos desafios na prevenção das infecções respiratórias causadas por fungos é a disponibilidade de diagnósticos laboratoriais com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. *Pneumocystis jirovecii* permanece uma importante causa de pneumonia (PCP) em pacientes imunocomprometidos e é a doença definidora mais comum de AIDS em portadores de HIV.

O diagnóstico da PCP requer especial atenção uma vez que o principal método para detecção de *P. jirovecii*, um organismo que não pode ser cultivado pelas metodologias rotineiramente utilizadas para o cultivo de fungos, é sua visualização em preparações de amostras respiratórias através de técnicas de coloração ou imunoensaios. Entretanto, a sensibilidade dos métodos é dependente do espécime clínico utilizado. Diversos grupos têm reportado o desenvolvimento de técnicas diagnósticas baseada na reação em cadeia da

polimerase (PCR) para detecção de *P. jirovecii*, e embora estes métodos apresentem boa sensibilidade, alguns apresentam uma baixa especificidade. Conseqüentemente, a validação de métodos moleculares e comparação com métodos tradicionalmente utilizados são fundamentais para o diagnóstico laboratorial da PCP. Com isso, nosso principal objetivo será Identificar estratégias para melhorar o fluxo de procedimentos no diagnóstico laboratorial da PCP através da análise da eficácia de método molecular relacionado às tecnologias de detecção de DNA visando maior rapidez e precisão no diagnóstico laboratorial desta micose, bem como comparar as técnicas já rotineiramente empregadas. As análises foram restritas a amostras respiratórias totalizando, aproximadamente, 30 espécimes clínicos submetidos ao Laboratório de Micologia, Setor de Diagnóstico Micológico e Imunodiagnóstico de pacientes com suspeita de diagnóstico de PCP. As análises foram realizadas utilizando PCR tendo como alvo a subunidade maior mitocondrial do RNA ribossômico (mtLSU rRNA). Estes resultados foram comparados com os resultados obtidos no diagnóstico estandarte através da reação de imunofluorescência direta realizada com o kit comercial MERIFLUOR PNEUMOCYSTIS Kit a detecção de antígeno de *P. carinii* (Meridian) e impregnação pela prata de esfregaços pelo método de Grocott e calcofluor. Estas amostras biológicas poderão ser utilizadas em projetos posteriores para comparação de resultados.

Pelo presente documento, os pesquisadores comprometem-se a não revelar a identidade dos pacientes em qualquer publicação resultante deste estudo, protegendo sua confidencialidade de acordo com as leis e regulamentações locais.

Rio de Janeiro, de 2013

