

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

NELSON ANTÓNIO MUNJOVO VILANCULO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PNEUMOCYSTIS JIROVECI E HISTOPLASMA  
CAPSULATUM EM PACIENTES INFECTADOS POR HIV NO HOSPITAL  
CENTRAL DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

Moçambique-Brasil

2017

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII* E *HISTOPLASMA  
CAPSULATUM* EM PACIENTES INFECTADOS POR HIV NO HOSPITAL  
CENTRAL DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

NELSON ANTÓNIO MUNJOVO VILANCULO

Dissertação apresentada ao curso de Ciências de Saúde do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique e o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fiocruz-Brasil, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciência da Saúde, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Rosely Maria Zancopé Oliveira e do Dr. Jahit Sacarlal

Moçambique – Brasil

2017

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Vilanculo, Nelson António Munjovo .

Detecção Molecular de Pneumocystis jirovecii e Histoplasma capsulatum em pacientes infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique / Nelson António Munjovo Vilanculo. - Maputo, 2017.

70 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas, 2017.

Orientadora: Rosely Maria Zancope Oliveira.

Co-orientadora: Jahit Sacarlal.

Bibliografia: f. 46-52

1. Imunocomprometidos pelo HIV. 2. Insuficiência Respiratória. 3. Pneumonia. 4. Pneumocystis jirovecii. 5. Histoplasma capsulatum. I. Título.

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII* E *HISTOPLASMA CAPSULATUM* EM PACIENTES INFECTADOS POR HIV NO HOSPITAL CENTRAL DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

NELSON ANTÓNIO MUNJOVO VILANCULO

Dissertação apresentada ao curso de Ciências de Saúde do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique e o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fiocruz-Brasil, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciência da Saúde.

Orientadores: Dr.<sup>a</sup> Rosely Maria Zancopé Oliveira  
Dr. Jahit Sacarlal

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr.<sup>a</sup> Alda Maria da Cruz - IOC/Fiocruz (Presidente)

---

Dr.<sup>a</sup> Dulce Bila – INS/ Maputo (Membro)

---

Dr.<sup>a</sup> Ana Olga Mocumbi– INS/ Maputo (Membro)

---

Dr. Mauro De Medeiros Muniz INI/Fiocruz (Revisor)

---

Dr. Nelson Tembe – INS/ Maputo (Suplente)

---

Dr. Renato Porozzi de Almeida - IOCI/Fiocruz (Suplente)

Dedico este trabalho a minha família, que muito me apoiou durante esta caminhada, em especial a minha esposa, a vocês todos vai o meu muito obrigado por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me ter acompanhado durante esta caminhada, por me ter confortado nos momentos difíceis e guardado desde o primeiro dia da minha vida.

A minha família, família esta que Deus me deu, muito obrigada pelo apoio moral. Em especial a minha esposa pelo incentivo e força que me deu nos momentos difíceis do trabalho. Sem todos vocês por várias vezes tive que estar ausente, me desligar da família para poder me concentrar nos estudos, não seria possível terminar esta caminhada. Vocês souberam compreender e levaram o barco adiante mesmo assim, sou muito grato a Deus por ter colocado vocês na minha vida.

Ao meu orientador Dr. Jahit Sacarlal, que confiou em mim, aceitou receber-me e ajudar a desenvolver esta pesquisa. Mesmo sabendo que seria um desafio levar a cabo um estudo, sob o risco de não obter resultados positivos, sempre me motivou, me deu força para prosseguir, dizendo sempre que iríamos ter bons resultados e que devíamos acreditar que o nosso estudo iria andar tal e qual queríamos em meio das dificuldades. Conseguia mesmo muito ocupado, disponibilizar alguns minutos para resolver os entraves e colocar a pesquisa a andar, muito obrigado por tudo.

A minha orientadora Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira por ter confiado em mim para o trabalho laboratorial da pesquisa, Tudo fez para que o trabalho andasse sem sobressaltos, desde o primeiro até o último momento foi uma mãezona, puxando-me “orelhas” sempre que fosse preciso, “apertando” para que o trabalho fosse executado dentro do tempo, mas acima de tudo sempre cuidadora de mim. Isso contribuiu bastante para o sucesso do meu trabalho, pois mesmo fora da minha família e do País, me sentia sempre amparado e protegido, e assim, conseguia estar animado e concentrado no trabalho. Por tudo que fez para que este sonho virasse realidade, e em especial pela excelente pessoa acolhedora e amável que és, o meu muito obrigado.

Aos Drs. Mauro de Medeiros Muniz, Manuel M. E. Oliveira, Fernando Almeida e Alfeu Passanduca pelo apoio e ensinamentos, pois sem a ajuda de todos não teria conseguido levar a cabo esta pesquisa, ao Dr. Nelson Macia, Dra. Alice Manjate, Dra. Darlene Kenga e todo o pessoal dos estudos de Pneumocistose e Sarcoma de Kaposi do Hospital Central de Maputo, a coordenação do Mestrado de Ciências de Saúde do Instituto Nacional de Saude e do pessoal da Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas no Brasil, o meu muito obrigado.

Ponha a sua vida nas mãos do Senhor, e confie nele, que ele te ajudará.  
Ele fará com que a sua honestidade seja como luz, e a justiça da sua causa, brilhe como sol no  
meio-dia. (**salmos 37.5:6**)

Tudo neste mundo tem o seu tempo, cada coisa tem a sua ocasião. (**Eclesiastes 3.1:8**)  
São palavras que muito me confortaram e me ajudaram durante nesta caminhada, e deixavam  
certo que passaria por momentos difíceis, mas teria um final feliz, pois há um Deus todo-  
poderoso que guia, guarda e protege.

## SIGLAS E ABREVIATURAS

DHL	Desidrogenase láctica
FBC	Fibrobroncoscopia
FM-UEM	Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane
HCM	Hospital Central de Maputo
Hc	<i>Histoplasma capsulatum</i>
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
INS	Instituto Nacional de Saúde
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
MtLSUrRNA	Subunidade Maior de RNA Ribossomal Mitocondrial
LBA	Lavado Broncoalveolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCP	Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
Pj	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema nervoso central
TARVc	Terapêutica Antirretroviral de combinação
TMP-SMZ	Trimetoprim-Sulfametoxazol



## SUMÁRIO

1. Introdução .....	8
1.1 Pneumocistose .....	9
1.1.1 Epidemiologia .....	10
1.1.2 Manifestações Clínicas.....	11
1.1.3 Diagnóstico .....	11
1.1.4 Tratamento .....	12
1.2 Histoplasmose .....	13
1.2.1 Epidemiologia .....	14
1.2.2 Contágio e Patogenia.....	15
1.2.3 Manifestações clínicas .....	17
1.2.4 Diagnóstico .....	19
1.2.5 Tratamento .....	20
1.3 Mecanismo de acção dos antifúngicos usados no tratamento de infecções fúngicas.....	21
1.3.1 Anfotericina B.....	21
1.3.2 Derivados azóis .....	21
1.3.3 Equinocandinas .....	21
2. Justificativa .....	23
3. Objectivos .....	25
3.1 Objectivo geral.....	25
3.2 Objectivos específicos.....	25
4. Metodologia .....	26
4.1 Desenho e local de estudo .....	26
4.2 População e amostra do estudo .....	26
4.3 Critérios de inclusão e exclusão .....	26
4.3.1 Critérios de inclusão.....	26
4.3.2 Critérios de exclusão.....	27
4.4 Diagnóstico clínico.....	27
4.5 Coleta de amostra pulmonar e procedimentos para o diagnóstico laboratorial.....	27
4.5.1 Procedimentos para coleta de amostras biológicas .....	27

4.5.2	Observação Directa .....	28
4.5.3	Detecção por Métodos Moleculares .....	29
5.	Considerações éticas .....	33
6.	Resultados .....	34
6.1	Características clinico-demográficas dos pacientes .....	34
6.2	Factores de risco a PCP .....	37
6.3	Factores de risco relacionada a Histoplasmosose .....	38
6.4	Sistema de pontuação e probabilidades de PCP dos pacientes participantes no estudo, de acordo com a classificação de pontuação de Smith, Forbes & Gazzaed (1992).....	39
6.5	Resultados obtidos pelas técnicas de observação direta e moleculares (PCR). .....	41
6.5.1	Observação direta pela coloração de Gram e Giemsa.....	41
6.5.2	Histopatologia .....	41
6.5.3	Exames Moleculares .....	42
6.5.4	Correlação entre os métodos laboratoriais .....	43
6.6	Sequenciamento .....	45
7.	Discussão .....	46
8.	Conclusão.....	50
9.	Bibliografia .....	51
10.	Apêndice e anexos .....	56
	APÊNDICE 1: Ficha de Seguimento Clínico .....	56
	APÊNDICE 2: Consentimento para a Realização de Fibrobroncoscopia com Lavado Broncoalveolar .....	62
	APÊNDICE 3 : Consentimento para Indução da Expectoração .....	64
	APÊNDICE 4: Declaração de Consentimento Informado.....	66
	APÊNDICE 5: Requisição para Identificação de <i>Pneumocystis jirovecii</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i> no LBA.....	70
	APÊNDICE 6: Protocolo de Extração de DNA.....	71
	APÊNDICE 7: Sistema de pontuação para PCP.....	72

## ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Achados sugestivos de Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> (PCP).....	11
Tabela 2. Sequência de Primers utilizados na PCR para detecção da região parcial do gene da $\beta$ -globina humana. ....	30
Tabela 3. Primers utilizados para amplificar a sequência do gene mtLSrRNA de <i>P. jirovecii</i> , e predicta 100kDa de <i>H. capsulatum</i> na nested PCR.....	31
Tabela 4. Condições dos ciclos térmicos aplicadas nas nested PCR .....	31
Tabela 5. Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo (n= 50)	35
Tabela 6. Características demográficas e clínicas dos pacientes em TARV. ....	37
Tabela 7. Características demográficas e clínicas dos pacientes com PCP .....	38
Tabela 8. Características demográficas e clínicas dos pacientes com suspeita clínica de infecção por <i>H. capsulatum</i> recrutados no HCM.....	39
Tabela 9. Probabilidade de PCP de acordo com pontuação final dos pacientes inclusos no estudo .....	40
Tabela 10. Probabilidade de PCP de acordo com score final .....	40
Tabela 11. Correlação entre os métodos laboratoriais para PCP por <i>P. jirovecii</i> e o sistema de probabilidade de score. ....	45

## ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Distribuição geográfica de <i>H. capsulatum</i> .....	15
Figura 2. Estrutura da célula fúngica e locais de acção dos anti-fúngicos, onde: I-local de acção da Anfotericina B, II-Derivados de Azois e III- Equinocardinas .....	21
Figura 3. Registo fotográfico de estruturas compatíveis com <i>Pneumocystes jirovecii</i> em amostra de LBA em um caso suspeito, pela técnica de prata-metanamina de amostra respiratória de paciente com suspeita clínica de PCP. 1.000x. ....	41
Figura 4. Padrão de bandas após eletroforese em gel de agarose a 1%. A) Fragmentos de DNA com 290 pb representativos de sequencia parcial do gene (mtLSUrRNA) do <i>P. jirovecii</i> . B) Fragmentos de 210 pb da sequência parcial do gene da proteína de 100kda (Hcp100) representativos de <i>H. capsulatum</i> .....	42
Figura 5. Diagrama de Venn representativo da ocorrência de PCP e histoplasmoses na população estudada.....	43
Figura 6. Relação entre probabilidade de PCP de acordo sistema de pontuação proposto por Smith, Forbes & Gazzaed (1992) e resultados do teste molecular (nested PCR) .....	44



VILANCULO, NAM. **DETECÇÃO MOLECULAR DE PNEUMOCYSTIS JIROVECII E HISTOPLASMA CAPSULATUM EM PACIENTES INFECTADOS POR HIV NO HOSPITAL CENTRAL DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE.** Rio de Janeiro, 2017. 83f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

## RESUMO

Apesar dos avanços verificados nas últimas décadas sobre o conhecimento da etiologia, epidemiologia e tratamento da pneumonia, ela ainda continua sendo uma das maiores causas de morbimortalidade a nível mundial. Na África, especialmente onde as condições climáticas e geográficas favoráveis associada a altas taxas de indivíduos imunocomprometidos, favorece o desenvolvimento e disseminação de agentes etiológicos fúngicos causadores destas patologias. Tais fatores predisponentes estão presente em Moçambique e também é verificada a ocorrência de pneumocistose (PCP) e/ou histoplasmose no país. Embora não existam publicações sobre a prevalência destas infecções fúngicas em Moçambique, há descrições da ocorrência de pneumonias causadas por *Pneumocystis jirovecii* (*Pj*), bem como co-infecção com outros fungos como *Histoplasma capsulatum*. Porém, na maioria dos casos de pneumonia se desconhecem os agentes etiológicos específicos, muitas vezes dando se mais ênfase a PCP, por falta de meios de diagnóstico ou estudos que provém o contrário, o que abre um campo para a investigação e identificação de outros agentes como *Histoplasma capsulatum* (*Hc*) no país. Por outro lado, o conhecimento do comportamento epidemiológico das doenças no país, e dos agentes etiológicos causadores da pneumonia é fundamental para que seja possível implantar medidas de controle e segurança contra estas patologias oportunistas. Neste estudo foram analisadas 50 amostras de lavado bronco-alveolar, de pacientes com suspeita de pneumonias internados ou em observação no Hospital Central de Maputo (HCM), e que foram encaminhadas para o laboratório de Microbiologia da Univeraidsde Eduardo Mondlane, para processamento. Para o diagnóstico foi usado a observação directa com as técnicas de coloração de Gram e Giemsa, coloração pelo método de Grocott e finalmente o *nested* PCR para identificação dos agentes etiológicos existentes nas amostras de lavado broncoalveolar. Os testes foram feitos em Moçambique e no Brasil, após seguidos todas as questões éticas incluindo a confidencialidade e anonimato. Entre as 50 amostras testadas com a *nested* PCR, 13 foram negativas, 18 positivas para *H. capsulatum*, 8 positivas para *P. jirovecii*, e 11 com coinfeções para ambos agentes etiológicos. Relacionando os resultados moleculares e o sistema de probabilidades, houve uma concordância em 15 indivíduos que apresentavam forte probabilidade de ter PCP (>83%), em aproximadamente 66% ( $n=10$ ) foram positivos na *nested* PCR, 2 positivos pela observação directa e 5 deles apresentaram estruturas fúngicas na histopatologia. Em conclusão, a técnica de *nested* PCR mostrou mais uma vez ser sensível em relação ao diagnóstico clínico e laboratorial convencional e a combinação da pontuação clínica e as técnicas de *nested* PCR ajuda no estabelecimento do diagnóstico definitivo das doenças fúngicas.

Palavras-chaves: 1. *Pneumocystis jirovecii*; 2. *Histoplasma capsulatum*; 3. HIV; 4.Co-infecções

VILANCULO, NAM. **DETECÇÃO MOLECULAR DE PNEUMOCYSTIS JIROVECII E HISTOPLASMA CAPSULATUM EM PACIENTES INFECTADOS POR HIV NO HOSPITAL CENTRAL DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE.** Rio de Janeiro, 2017. 83f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

### ABSTRACT

Despite the advances made in the last decades regarding knowledge of the etiology, epidemiology and treatment of pneumonia, it still remains one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. In Africa, especially where favorable climatic and geographical conditions associated with high rates of immunocompromised individuals, favors the development and dissemination of fungal etiological agents that cause these pathologies. Such predisposing factors are present in Mozambique and the occurrence of pneumocystosis (PCP) and / or histoplasmosis in the country is also verified. Although there are no publications on the prevalence of these fungal infections in Mozambique, there are descriptions of the occurrence of pneumonia caused by *Pneumocystis jirovecii* (*Pj*), as well as co-infection with other fungi such as *Histoplasma capsulatum* (*Hc*). However, in the majority of cases of pneumonia, the specific etiologic agents are not known, often giving more emphasis to PCP, due to the lack of means of diagnosis or studies that provide otherwise, which opens a field for the investigation and identification of other agents like *H. capsulatum* in the country. On the other hand, the knowledge of the epidemiological behavior of the diseases in the country, and of the etiological agents that cause pneumonia is fundamental so that it is possible to implement control and safety measures against these opportunistic pathologies. In this study, 50 samples of bronchoalveolar lavage were analyzed, from patients suspected of hospitalized or observed pneumonia at Maputo Central Hospital (HCM), who were referred to the laboratory of Microbiology at Eduardo Mondlane University for processing. For the diagnosis, direct observation with the Gram and Giemsa staining techniques, staining by the Grocott method and finally the nested PCR were used to identify the etiologic agents present in the bronchoalveolar lavage samples. The tests were conducted in Mozambique and Brazil, following all ethical issues including confidentiality and anonymity. Of the 50 samples tested with the nested PCR, 13 were negative, 18 positive for *H.capsulatum*, 8 positive for *P. jirovecii*, and 11 with co-infections for both etiological agents. In agreement with the molecular results and the probability system, there was a concordance in 15 individuals with a high probability of having PCP (>83%), in approximately 66% (n =10) were positive in nested PCR, 2 positive by direct observation and 5 of them had fungal structures in histopathology. In conclusion, the nested PCR technique was once again sensitive to conventional clinical and laboratory diagnosis and the combination of clinical scores and nested PCR techniques helps to establish the definitive diagnosis of fungal diseases.

Keywords: 1. *Pneumocystis jirovecii*; 2. *Histoplasma capsulatum*; 3. HIV; 4. Co-infections

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços verificados nas últimas décadas sobre o conhecimento da etiologia, epidemiologia e tratamento das complicações pulmonares, elas continuam sendo uma das maiores causas de morbi-mortalidade a nível mundial em hospedeiros imunocomprometidos<sup>1,2</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a nível mundial, cerca de 36.7 milhões de pessoas estavam vivendo com o HIV, e 2,1 milhões teriam sido infectados, sendo que 17 milhões estariam em TARV<sup>3</sup>, sendo que para a região africana cerca de 19.1 milhões de pessoas estariam vivendo com HIV e há 940.000 novas infecções em todas as idades, dos quais 10.252.400 beneficiam de TARV<sup>4</sup>.

As doenças causadas por estes fungos são mais severas em indivíduos imunocomprometidos pelo HIV, que segundo os dados publicados pela UNICEF em 2014, a prevalência de HIV tende a aumentar nos últimos anos, colocando Moçambique na 8ª posição a nível mundial, onde 11,5% da população adulta entre 15 a 49 anos é soropositiva. Além disso, boa parte destes pacientes não se beneficiam de terapia antirretroviral, tornando maior a probabilidade de ocorrência de pneumonias causadas por fungo<sup>3</sup>.

Com um número crescente de pessoas vivendo com HIV, o risco de ocorrência de doenças oportunistas é maior, devido a uma redução e deficiências nas defesas celulares, bem como na funcionalidade e no número de células CD4, que são uma parte importante do sistema imunológico contra várias doenças, principalmente se os pacientes não estiverem em tratamento anti-retroviral, uma situação comum nos países em desenvolvimento<sup>4,5</sup>. Nestes países, muitos dos pacientes não têm conhecimento que são portadores, e somente são diagnosticados quando apresentam alguma queixa clínica ou já em estado grave. Isto acontece em cerca de 65% dos novos casos diagnosticados HIV positivos, dos quais 80% já mostram sinais de gravidade, tais como comprometimento pulmonar e insuficiência respiratória sugestivo de infecções por fungos, e com contagem de células CD4 abaixo de 200/mm<sup>6,7,8,9</sup>.

Para o diagnóstico das infecções fúngicas, a história clinico-epidemiológica dos pacientes e os exames de imagem ajudam bastante, principalmente no diagnóstico presuntivo, que poderá orientar para a escolha da amostra clínica a ser solicitada. Porém, os testes laboratoriais são feitos de forma tardia e são demorados, é neste contexto que surgem as técnicas moleculares para o



diagnóstico, usando a reacção em cadeia de polimerase (PCR) de diferentes formatos, bem como as técnicas histopatológicas<sup>5,10,11</sup>, embora a PCR não distingua a infecção da colonização<sup>12,13,14</sup>.

São várias as secreções respiratórias usadas para o diagnóstico das micoses, tais como escarro, liquor e lavado broncoalveolar (LBA). Com estas amostras é possível obter com maior precocidade a identificação da presença do agente, de forma a reduzir a morbi-mortalidade que chega actualmente em cerca de 70-90% dos casos<sup>1,10,13</sup>. Vários estudos sugerem que a utilização de LBA é o mais indicado para o diagnóstico micológico, pois o mesmo apresenta maior sensibilidade (70-100%) e especificidade (82 a 100%) quando comparada com o soro e cultura de pacientes imunocomprometidos<sup>13</sup>.

Existem dados que apontam uma prevalência de 55% das infecções fúngicas oportunistas que atingem os pulmões na população africana, sendo o *Pneumocystis* o mais isolado, seguido de *H. capsulatum*<sup>1,18</sup>. Para além dos agentes etiológicos acima citados, existem outros que são encontrados em amostras de LBA, que são os *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Rhodococcus equi* e *Citomegalovirus*, sendo os dois últimos frequentemente encontrados, mas sem relação directa com a doença<sup>15,16,17</sup>.

## 1.1 Pneumocistose

A pneumocistose ou pneumonia causada pelo fungo *Pneumocystis jirovecii* (antes referido como *Pneumocystis carinii*) é uma infecção oportunista causadora de pneumonia grave em indivíduos com o sistema imunológico comprometido pela infecção por HIV, por transplantes, doenças malignas, doenças do tecido conjuntivo<sup>19,20</sup>. Este fungo é oportunista, colonizador específico de seres humanos, onde a transmissão ocorre de pessoa para pessoa, podendo ser transmitido de uma pessoa saudável e colonizada ou por alguém com pneumonia por *P. jirovecii*. A colonização e infecção é independente do grau do comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, embora continue a ser identificado como o principal causador de pneumonia em indivíduos infectados por HIV, no estado avançado da imunodepressão. As pessoas imunocompetentes ou com grau moderado de imunodeficiência de qualquer origem, desempenham um papel essencial na transmissão intermitente de *P.jirovecii* pois são reservatório do agente infeccioso<sup>20,21</sup>.

### 1.1.1 Epidemiologia

No início da epidemia do HIV/AIDS, a PCP (pneumonia causada por *P.jiroveci*) foi reconhecida como a doença definidora da AIDS nos países industrializados. Nos Estados Unidos da América, a PCP foi responsável por mais de 20.000 novos casos da AIDS por ano entre 1990 e 1993. Na Europa, em 2008, a PCP foi a principal doença indicadora da AIDS, responsável pelo diagnóstico de cerca de 16.4% de casos nos adultos e adolescentes<sup>22</sup>. Nos países industrializados, com a introdução da TARVc e da quimioprofilaxia com Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMZ) para o PCP, a ocorrência desta doença reduziu substancialmente. Apesar deste avanço e por razões não totalmente esclarecidas, a PCP continua a ser uma doença bastante comum em indivíduos infectados por HIV<sup>19,22,23</sup>.

Na região Subsahariana, pensava-se que a PCP ocorresse com baixa frequência em infectados por HIV. Na origem da baixa notificação da PCP, vários factores foram sugeridos. Dentre eles os seguintes: a especulação segundo a qual a morte precoce não permitia que doentes africanos infectados por HIV atingissem o grau de imunossupressão que os tornasse susceptíveis de desenvolverem a PCP; a utilização de técnicas de diagnósticos menos sensíveis; falta de pessoal de laboratório devidamente qualificado; ocorrência de estirpes menos virulentas; variação sazonal<sup>21,22</sup>. Na população pediátrica Africana foram reportadas uma prevalência de PCP ao redor dos 51%. Em adultos e dependendo do método de detecção aplicado os dados variam de 43% na África do Sul, 39% em Uganda e 33% no Zimbabue<sup>22</sup>. Em Moçambique, foi documentada uma prevalência de 19% em doentes admitidos no Hospital Central de Maputo (comunicação oral, Dr.<sup>a</sup> Elisabete Nunes, 2013). Posteriormente, foi comprovada elevada mortalidade atribuída à PCP em infectados por HIV. Esta varia entre 14 e 44% em crianças e 9 a 14% em adultos<sup>19,23,24</sup>.

Em vários países africanos, devido a escassez de meios auxiliares de diagnóstico e de pessoal de laboratório devidamente treinado, o diagnóstico da PCP é principalmente empírico, baseando-se nos dados clínicos e achados radiológicos. Por conseguinte, os doentes são tratados com TMP-SMZ (Trimetoprim-sulfametoxazol) sem confirmação laboratorial, num contexto em que o fármaco é extensivamente usado no tratamento de outras patologias infecciosas, facto que pode levar à emergência e disseminação de estirpes de *P. jirovecii* resistentes ao TMP-SMZ<sup>25,34</sup>.

### 1.1.2 Manifestações Clínicas

Os principais achados ao exame físico incluem taquipneia, taquicardia e ausculta pulmonar normal ou com estertores finos (ou crepitantes) ao final da expiração. Sibilos, sinais de condensação pulmonar ou derrame pleural são raramente encontrados. O exame físico é normal em até 50% dos casos <sup>9,21,24</sup>.

O achado radiográfico mais típico de PCP é o infiltrado intersticial peri-hilar e simétrico. Pneumatoceles e pneumotórax também podem ser observados, infiltrados apicais bilaterais são apresentações comuns de PCP em pacientes em uso de pentamidina inalatória profilática. Ressalta-se que a radiografia de tórax pode ser normal em até um quarto dos casos de PCP, nessa situação, a TC (tomografia computadorizada) pode revelar atenuação pulmonar em vidro fosco <sup>9,21,24</sup>.

### 1.1.3 Diagnóstico

Não há características clínicas ou imagem radiológica específicas de PCP, sendo seu diagnóstico geralmente presuntivo, baseado em dados clínicos, laboratoriais e de imagem compatíveis. Existe uma lista de achados sugestivos de PCP, como consta na Tabela 1, no entanto, o diagnóstico definitivo é realizado pela identificação do agente por meio das colorações de azul de toluidina, *Grocott*, *Giemsa* ou técnica de imunofluorescência a partir de espécimes respiratórios, podendo também se usar testes moleculares <sup>21</sup>.

Tabela 1. Achados sugestivos de Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PCP)

- 
1. Contagem de LT-CD4+ < 200 células/mm<sup>3</sup> ou sinais clínicos de imunodepressão grave, como candidíase oral;
  2. Dispneia progressiva aos esforços;
  3. Presença de febre, taquipneia ou taquicardia ao exame físico;
  4. Radiografia de tórax normal ou infiltrado pulmonar difuso, peri-hilar, simétrico;
  5. Desidrogenase láctica (DHL) sérica elevada;
  6. Hipoxémia em repouso ou após esforço;
  7. Ausência de uso ou utilização irregular de quimioprofilaxia para PCP.
-

A pesquisa directa do agente oportunista em amostras de escarro espontâneo ou induzido por colorações convencionais e técnicas de imunofluorescência directa (IFD) geralmente é pouco sensível para PCP<sup>21</sup>. Contudo o diagnóstico molecular da PCP se dá directamente pela detecção do DNA do agente em amostras clínicas, mesmo que a sua presença seja muito reduzida. Há que se ter cuidado na interpretação destes resultados, pois o ser positivo não significa directamente existência da doença, pois pode ser que o microrganismo encontre-se na forma latente. Entretanto, não se deve descartar este resultado, visto que o agente pode provocar processos inflamatórios que podem comprometer os pulmões, bem como, encontrar condições favoráveis para sua proliferação e proliferar<sup>12,21</sup>.

Um dos meios muito importantes no diagnóstico são os achados radiológicos, como a observação de nódulos. Infiltrado intersticial ou nodular, porém não ajuda na confirmação do agente patogénico, embora um procedimento mais agressivo as amostras biológicas obtidas por broncoscopia com lavado broncoalveolar e biópsia pulmonar transbrônquica elevam a precisão do diagnóstico etiológico<sup>21, 25</sup>.

#### **1.1.4 Tratamento**

A escolha do regime terapêutico é guiada pela gravidade clínica do paciente, segundo a classificação da pneumonia; em leve a moderada ou moderada a grave<sup>21,22,23</sup>.

##### **Pneumonia leve a moderada (PaO<sub>2</sub> ≥ 70 mmHg)**

Os regimes indicados incluem medicações administrada preferencialmente por via oral. A primeira escolha é sulfametoxazol combinado com trimetoprima, com 15-20 mg por dia, por via oral a cada seis ou 8 horas por 21 dias. O regime alternativo para casos de intolerância há sulfamidas é clindamicina 300 mg oral a cada seis horas adicionando primaquina 15-30 mg oral uma vez ao dia por 21 dias<sup>22,23</sup>.

##### **Pneumonia moderada a grave (PaO<sub>2</sub> < 70 mmHg)**

Recomendam-se esquemas administrados preferencialmente por via endovenosa, a mudança de via de administração de endovenosa para oral deve ser realizada quando ocorrer

melhora clínica. O regime de escolha é a associação de sulfametoxazol mais trimetoprima (5 mg/kg de trimetoprima) endovenosa a cada seis ou oito horas. O tempo total de tratamento é de 21 dias. Clindamicina 600 mg endovenosa a cada seis ou oito horas, mais primaquina 15-30 mg oral uma vez ao dia<sup>22,23</sup>.

## 1.2 Histoplasmose

A histoplasmose é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, que é um fungo eucariota pertencente ao reino Fungi e que encontra-se no filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Histoplasma* (*Ajellomyces*)<sup>26</sup>. A espécie *Histoplasma capsulatum* engloba três variedades distintas: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente da histoplasmose capsulata ou clássica, *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, agente etiológico da linfangite epizoótica dos equinos<sup>11,26</sup>. A variedade de *H. capsulatum* pode ser diferente de acordo com o local estudado. Duas variedades de *H. capsulatum* são patogênicas para o homem: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, com distribuição cosmopolita, porém mais descrita no continente americano e *H. capsulatum* var. *duboisii*, encontrado no continente africano, esta distribuição está associada a diversos factores, confirmando a ideia de que o clima moderado, a humidade e as características do solo colaboram para caracterizar como área endêmica de *Histoplasma*<sup>26</sup>.

*H. capsulatum* é um fungo saprófito do solo, que cresce na forma miceliar a temperatura de 25°C, em associação com solos úmidos contendo elevados teores de nitrogênio. O fungo tem sido encontrado em dejectos de aves e morcegos, cavernas, árvores ocas, construções antigas e sótãos, sendo estes, fontes importantes de infecção e, após demolição de prédios e o revolvimento do solo contaminado proporciona contato com propágulos infectantes pelo transporte pelo ar<sup>6,27,39</sup>. Por ser um fungo dimórfico, em parasitismo se converte a como levedura o mesmo ocorrendo quando cultivados a 37°C. Em temperaturas inferiores a 35°C, *H. capsulatum* se apresenta como colônias brancas a acastanhadas, algodonosas, microscopicamente caracterizado por hifas hialinas, septadas, ramificadas e de morfologia típica representada por macroconídios, medindo de oito a 16µm de diâmetro, geralmente esféricos, inicialmente de parede lisa, desenvolvendo com o envelhecimento da colônia, em projeções semelhantes a tubérculos, e ainda

microconídios ovais com diâmetros de dois a cinco micrômetros, de paredes lisas<sup>28,29,28</sup>. Estes últimos são as partículas infectantes deste fungo para os homens e animais susceptíveis.

Em parasitismo, ou a partir de espécimes clínicos cultivados a 37°C em meios de cultura apropriados, *H. capsulatum* se apresenta como colônias de aspecto úmido, lisa e de coloração branco-amarelada. Microscopicamente, se mostra como pequenas leveduras, medindo de dois a quatro micrômetros de diâmetro, esféricas ou ovais, de paredes finas e unibrotantes<sup>29,28</sup>.

### 1.2.1 Epidemiologia

A histoplasmose tem uma ampla distribuição geográfica (Fig. 1), tendo-se detectado casos em mais de 60 países, no entanto, apresenta nítido predomínio nas Américas, leste da Ásia e Oceânia e na África Subsaariana. Nas Américas, estende-se desde o sul do Canadá até as regiões centrais da Argentina. As zonas endêmicas mais importantes se situam nos vales do Rio Mississipi, Missouri e Ohio na América do Norte; na Bacia do Rio Prata e na Serra do Mar na América do Sul. Na Europa, têm sido descritos poucos casos autóctones<sup>28,29</sup>.

A maior parte do conhecimento sobre histoplasmose veio de relatos de epidemias resultantes da exposição de um certo número de indivíduos a uma mesma fonte de infecção, sendo mais facilmente reconhecidas por afectarem um grupo de pessoas ao mesmo tempo, que trabalhavam em construção e caça<sup>6,30</sup>. Em uma pequena cidade de Indianápolis, EUA, ocorreu uma das maiores epidemias de histoplasmose, logo após desmatamento de um bosque<sup>16</sup>. O vento levou a poeira a prédios vizinhos resultando em 120.000 pessoas presumivelmente infectadas, 488 casos da doença e 60 casos fatais ou com histoplasmose muito grave<sup>5, 7, 28, 31</sup>.

Em um estudo realizado numa região do Panamá, de 1997 a 2003, dos 2.379 pacientes admitidos na enfermaria de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) do hospital em estudo, a histoplasmose representou 7,65% das admissões, ou seja, 182 pacientes com HIV ou AIDS apresentaram cultura positiva para *H. capsulatum*<sup>728</sup>. Em um estudo realizado em Buenos Aires, Argentina no ano de 1994, 44 pacientes foram internados com histoplasmose, dentre os quais; 36 em associação com AIDS<sup>32,33</sup>. No Brasil algumas regiões são endêmicas para histoplasmose, havendo regiões com positivities em testes intradérmicos com histoplasmina em cerca de 98% da população<sup>7, 26, 27, 28, 32</sup>. Em relação a África, há relatos de casos de histoplasmose

na África do sul, Zimbábue, Burkina Fasso, Camarões, Uganda e Tanzânia em pacientes imunocomprometidos pelo vírus de HIV <sup>7,18,,32,34</sup>.

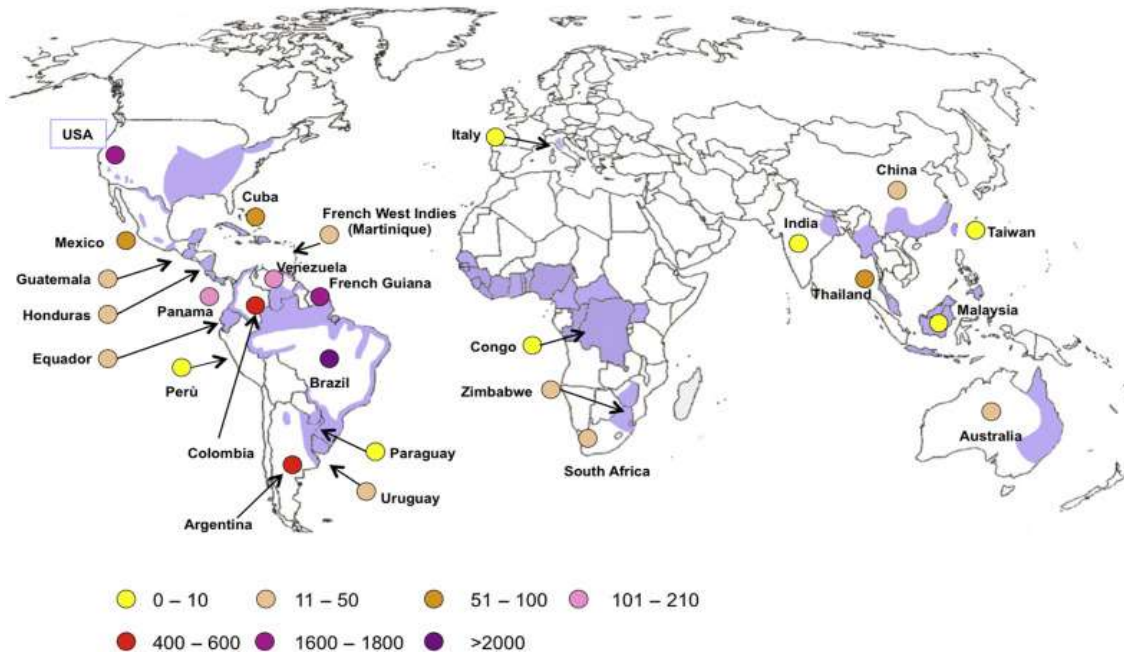


Figura 1. Distribuição geográfica de *H. capsulatum*

*Legenda:* var. *capsulatum* (violeta) e *duboisii*, áreas sobrepostas (violeta + sombreado). Os círculos indicam o número de casos publicados de histoplasmose associada à AIDS. A maioria dos casos de pacientes positivos oriundos de África tem sido diagnosticados fora do continente Africano (adaptado de Wheat et al., 2016) <sup>27</sup>

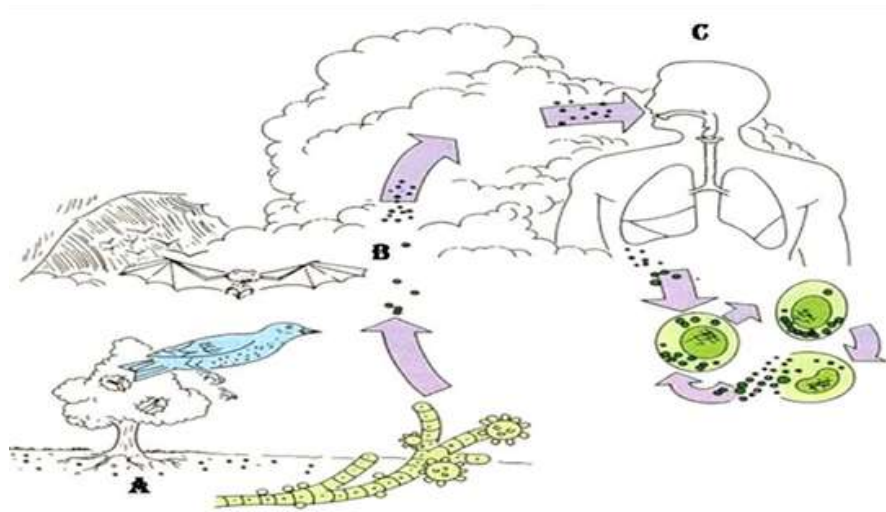
### 1.2.2 Contágio e Patogenia

Este fungo tem habitat no solo, podendo permanecer viável por tempo prolongado, tendo como outro reservatório os morcegos (considerados portadores crônicos), pois são encontrados nas fezes das aves e morcegos um ótimo meio de crescimento. O contágio por este fungo se dá através da inalação de conídios, desenvolvendo-se a primeira infecção no pulmão (Fig.2). Na maioria dos indivíduos, esta infecção é benigna, passando despercebida ou com sintomas semelhantes à uma gripe, do tipo resfriado comum principalmente em indivíduos imunocompetentes <sup>31</sup>. Como sequelas, podem ficar calcificações residuais nodulares no pulmão, semelhante ao que ocorre na tuberculose. Alguns indivíduos principalmente pessoas com idades extremas (menores de 1 ano e maiores de 60 anos de idade), pessoas com deficiência imune que estão em tratamento com



corticóides, leucêmicos, transplantados, pacientes que estão fazendo quimioterapia ou pacientes com AIDS, podem apresentar a forma disseminada da infecção <sup>32</sup>. Existem fatores que influenciam na preservação e evolução da doença como a quantidade de esporos inalados e o estado imune do hospedeiro. A grande maioria das infecções é assintomática, por afectarem indivíduos imunocompetentes e com pouca exposição ao fungo <sup>8,32</sup>. Os conídios inalados, chegam aos pulmões e estimulam uma resposta inflamatória no hospedeiro, porém, para evitar a acção dos fagócitos e permanecer no ambiente intracelular, eles adoptam vários mecanismos de defesa <sup>29</sup>.

Figura 2. Ciclo biológico de *Histoplasma capsulatum*



Legenda: (A) Solo enriquecido com guano de aves e morcegos, meio favorável para o desenvolvimento dos fungos, (B) Poeira levanta os conídios para o ar. (C) Inalação de microconídios infectantes presentes na poeira (adaptado) <sup>29</sup>

#### Resposta do hospedeiro para acção dos conídios:

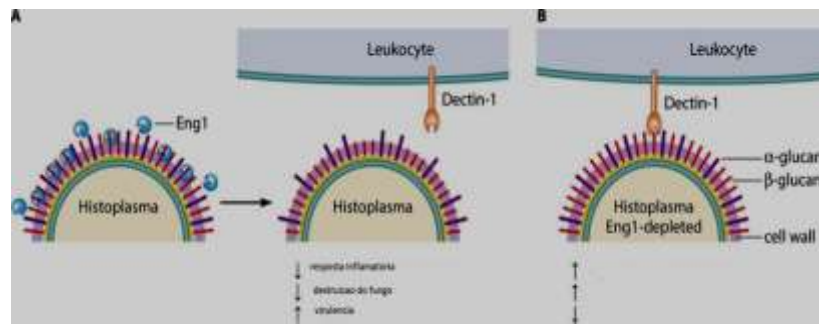
- Os conídios entram pelas vias aéreas, onde o primeiro mecanismo de acção são as barreiras físicas ou mecânicas (retenção pelos cílios do epitélio respiratório, liberação de muco nasal e reflexo de tosse), mais devido ao tamanho, e alguns deficiência neste mecanismo (imunocomprometimento do hospedeiro) os propágulos podem chegar aos alvéolos, onde há activação da defesa celular <sup>27,29</sup>.
- Pela deficiência na produção e função neste mecanismo de defesa celular pelo imunocomprometimento pelo HIV, os propágulos não são contidos pelas barreiras



Mecanicas e chegam aos pulmões onde entre 12 a 15h germinam e formam estruturas leveduriformes <sup>27</sup>.

Porém, os fungos possuem PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos) presentes na superfície, para o caso da *Histoplasma*, o PAMP é o  $\beta$ -glucano, que quando reconhecidos pelos receptores padrões de reconhecimento (PRR) activam a resposta imune inata. Como forma de evitar o reconhecimento antigénico do  $\beta$ -glucano pelas células do sistema imune, o *H. capsulatum* produz uma segunda camada, o  $\alpha$ - $\beta$ 1,3 glucano tal como mostra a Figura 3.

Figura 3. Padrões moleculares associados aos patógenos *Histoplasma capsulatum*



Legenda: A figura ilustra os padrões moleculares associados aos patógenos de *Histoplasma capsulatum*, na ligação com o  $\alpha$ - $\beta$ 1,3-glucano<sup>16</sup>.

### 1.2.3 Manifestações clínicas

A histoplasmose pode ficar restrita aos pulmões ou ocorrer à disseminação para os linfonodos mediastinais e todo o sistema fagocítico-mononuclear, acometendo vários órgãos como baço e medula óssea. Formas progressivas e disseminadas da histoplasmose, assim como a gravidade das manifestações clínicas, em geral, são decorrentes da reativação fúngica quando existem falhas da imunidade celular ou dos mecanismos de fagocitose e lise dos macrófagos <sup>6</sup>.

### Histoplasmose pulmonar aguda

No entanto, infecção pulmonar aguda grave também pode ocorrer quando um indivíduo é exposto a um grande inóculo de *H. capsulatum*. Os casos sintomáticos desta micose, em

indivíduos imunocompetentes, apresentam-se comumente como infecções autolimitadas do trato respiratório. A inalação abundante de conídios de *H. capsulatum* leva ao surgimento de uma forma pulmonar aguda, em geral, após duas a três semanas da exposição ao fungo. Nesta forma clínica os sintomas podem ser identificados de 85,0 a 100% dos casos, nos quais se constata febre, calafrios, mialgia, anorexia, tosse, dispneia, cefaleia, e dor torácica. Entretanto, todos estes sintomas são inespecíficos, e portanto, podem ser comumente observados em outras doenças<sup>11,33</sup>. Na maioria dos casos, esta forma clínica tende a regredir sem tratamento específico em duas a quatro semanas<sup>7,15</sup>. A histoplasmose pulmonar aguda é observada em casos isolados ou sob a forma de surtos epidêmicos, em pessoas que realizam atividades recreativas ou laborais, em locais onde há micronichos do fungo<sup>34</sup>.

### **Histoplasmose pulmonar crônica**

Em indivíduos com lesões pulmonares pré-existentes, como enfisema centrolobular ou bolhoso, ou defeitos anatômicos estruturais, a histoplasmose pode ocorrer sob a forma pulmonar crônica. Neste caso, a histoplasmose apresenta características extremamente similares à tuberculose, com formação de granulomas e acometimento da região apical-posterior dos pulmões, já que estas lesões pulmonares favorecem a instalação do foco inicial da doença. Esta forma, em geral, ataca indivíduos com mais de 50 anos de idade, tabagistas e portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica<sup>15,34</sup>.

### **Histoplasmose disseminada**

A forma disseminada da histoplasmose ocorre principalmente em pessoas imunodeprimidas, como em pacientes com neoplasias hematológicas (leucemias e linfomas), transplantados, em uso prolongado de corticosteroides e indivíduos com AIDS. Entretanto, cerca de 20,0% dos casos ocorrem em pessoas saudáveis que foram expostas a um inóculo maciço. Esta é uma forma clínica definida pela presença de foco extrapulmonar e extraganglionar de curso progressivo<sup>49,50</sup>. Febre persistente, perda de peso e esplenomegalia são os achados clínicos mais frequentes na histoplasmose disseminada. Outros sinais e sintomas que podem ser observados incluem adenopatias, hepatoesplenomegalia, tosse, adinamia e sudorese<sup>6,7</sup>. Em geral, observa-se infiltrado pulmonar intersticial à radiografia de tórax, e pancitopenia ao hemograma<sup>10</sup>. A ocorrência de manifestações cutâneas em áreas não endêmicas pode ser menor que 1,0%, no

entanto, existem estudos que mostram que manifestações cutâneas de histoplasmose disseminada ocorrem com maior frequência em pacientes com AIDS<sup>6,7,10</sup>. Pacientes com infecção mista (AIDS e histoplasmose), procedentes da América do Sul, especialmente do Brasil, apresentam alguma lesão de pele, em até 80,0% dos casos<sup>15,27,35</sup>.

A imunodepressão grave em decorrência da HIV predispõe à disseminação extrapulmonar da histoplasmose, principalmente em indivíduos com linfócitos T CD4+ menor que 200 células/mm<sup>3</sup>, apresentando-se com manifestações graves, rapidamente progressivas e fatais, em até 30% dos casos. Em geral, ocorre disseminação fúngica para vários órgãos e tecidos, o que requer agilidade no diagnóstico e tratamento da histoplasmose<sup>15,27,35</sup>. Vale ressaltar que em hospedeiros imunodeprimidos, mesmo cepas consideradas de baixa virulência, semelhantes à cepa "Downs", tornam-se virulentas, causando a histoplasmose disseminada<sup>22</sup>. Isso ocorre, devido à reativação endógena de focos quiescentes de fungos viáveis encontrados dentro de granulomas. Com isso, quando há uma queda da imunidade celular, infecções disseminadas ocorrem por reativação da infecção latente de *H. capsulatum*, mesmo muitos anos após a infecção primária<sup>25</sup>.

Endocardite, infecção vascular e infecção de sistema nervoso central (SNC) por *H. capsulatum* também são descritas de forma isolada, entretanto, são formas clínicas menos comuns desta micose<sup>15,27,35</sup>. Pacientes com histoplasmose disseminada podem apresentar comprometimento do SNC em até 20,0% dos casos. Complicações como mediastinite, pericardite, broncolitíase e envolvimento pleural podem ocorrer em pacientes com histoplasmose pulmonar. Fibrose mediastínica é uma complicação grave e frequentemente letal, porém observa-se raramente em indivíduos que apresentaram a forma pulmonar aguda da histoplasmose<sup>35</sup>.

#### **1.2.4 Diagnóstico**

O diagnóstico da histoplasmose baseia-se nos aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos e epidemiológicos, uma vez que sua sintomatologia é inespecífica, facto que pode gerar um diagnóstico equivocado. Com isso, é fácil compreendermos a necessidade de métodos diagnósticos específicos, mantendo as evidências clínicas como suporte e guia para os demais diagnósticos<sup>10,11,49</sup>.

Para um diagnóstico correcto, cabe destacar a técnica exacta, que deve basear-se no estado de saúde do paciente e se este apresenta histórico de permanência em país endémico. Também é

necessária a obtenção de uma amostra adequada, principalmente respiratória, e a punção ou aspiração de medula óssea. A abordagem diagnóstica varia, em parte, com a síndrome clínica em consideração. Contudo, o diagnóstico definitivo de histoplasmose deve ser confirmado através de exames laboratoriais que vão desde a observação directa, cultura e exames moleculares<sup>10, 39</sup>.

A observação directa encontra-se dividida em 3 grupos, sendo o primeiro em que as preparações são a fresco adicionadas com KOH ou soro fisiológico, o segundo grupo consiste na utilização de corantes como azul de Lactofenol, tinta-da-china, calcoflúor, e a terceira consiste na fixação por chama para coloração técnica de Gram, Giemsa e Ziehl permite um diagnóstico presuntivo e rápido, porem estes exames tem sensibilidades reduzidas quando comparadas com os outros métodos diagnósticos, e não permite a identificação da espécies fúngicas em questão, face as semelhanças existentes entre eles, porem, quando associado ao exame cultura permite o aumento da sua sensibilidade e reduz os resultados falsos positivos <sup>10,29,36</sup>.

A cultura pode ser feita a partir de vários productos biológicos, e a incubação primária tem sido 35°C, porem isso varia de acordo com o tipo de fungo, e podendo ser de 2 a 20 dias <sup>39</sup>. As técnicas moleculares são mais sensíveis e especificas para o diagnóstico fúngico.

### **1.2.5 Tratamento**

A histoplasmose geralmente é uma infecção benigna e autolimitada. Os casos de regressão espontânea não necessitam de tratamento específico, sendo repouso e observação clínica as medidas mais eficazes. O cetoconazol constitui o tratamento utilizado para infecção leve ou moderada. Na doença disseminada, o tratamento sistêmico com anfotericina B é quase sempre curativo, embora alguns pacientes possam necessitar de tratamento prolongado e de monitorização, devido à ocorrência de recidivas. Tipicamente, os pacientes com AIDS sofrem recidiva apesar da terapia, que seria curativa em outros indivíduos. Por consequência os pacientes com AIDS necessitam de terapia de manutenção com cetoconazol por via oral ou com anfotericina B semanalmente <sup>4,29</sup>.

### 1.3 Mecanismo de acção dos antifúngicos usados no tratamento de infecções fúngicas

#### 1.3.1 Anfotericina B

A anfotericina B foi descoberta, em 1955, por Gold e colaboradores, quando investigavam uma estirpe de *Streptomyces nodosus*, o seu carácter anfotérico, que lhe dá o nome, depende da existência de um grande anel lactâmico com uma cadeia lipofílica rígida contendo sete ligações duplas conjugadas, e uma porção hidrofílica, a sua actividade a nível da célula fúngica depende da sua ligação à ergosterol, o principal esterol da membrana celular fúngica<sup>31</sup>. O esterol é utilizado principalmente para manter a estrutura e a função da membrana plasmática, nos fungos, isso é feito pelo ergosterol, enquanto nos humanos pelo colesterol. Quando a anfotericina B se liga à ergosterol, formam-se canais iónicos na membrana celular que destroem a integridade osmótica da membrana celular fúngica e levam à perda dos constituintes intracelulares e à morte celular<sup>1,28,53</sup>.

#### 1.3.2 Derivados azóis

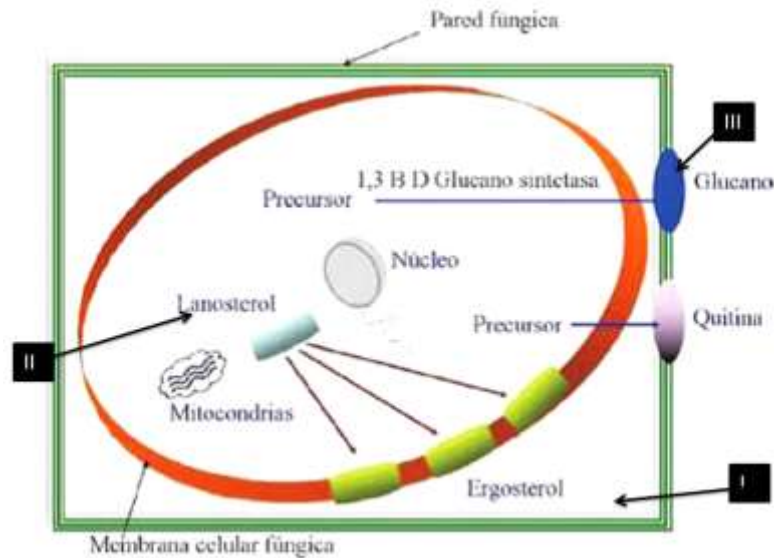
Os derivados de azóis incluem dois grandes grupos: os imidazóis e os triazóis, que partilham o mesmo mecanismo de acção e têm um espectro antifúngico semelhante. Os triazóis distinguem-se dos imidazóis por terem três átomos de azoto no anel azol. Os triazóis são moléculas mais recentes, apenas para uso sistémico e incluem o itraconazol, o fluconazol, voriconazol e o posaconazol<sup>54</sup>. Eles actuam inibindo a produção da enzima 14- $\alpha$ -demetilase do lanosterol, uma enzima ligada ao citocromo p450, envolvida na conversão do lanosterol em ergosterol. Desta forma, os Azóis inibem a síntese de ergosterol da membrana celular fúngica, impedindo sua na célula fúngica (fungistático) ou na morte celular (fungicida) tal como mostra a figura 4<sup>1,28,53</sup>.

#### 1.3.3 Equinocandinas

As equinocandinas são a classe de antifúngicos mais recentes e constituem um importante avanço na terapêutica antifúngica. Pertencem a esta classe a caspofungina, a micafungina, a anidulafungina e outros análogos ainda em fase de investigação. Atuam sobre o complexo enzimático da parede fúngica,  $\beta$ -1,3-D-glicano sintetase e seus precursores, inibindo sua síntese, danificando a parede celular e tendo assim, uma acção fungicida por lise osmótica, isto porque o

$\beta$ -1,3-D-glicano é exclusivo da parede celular fúngica, esta classe de agentes é seletiva em sua toxicidade, figura 4 <sup>1,28,53</sup>.

Figura 4. Estrutura da célula fúngica e locais de acção dos antifúngicos. Retirada do site <http://gsdl.bvs.sld.cu/greenstone/collect/enfermeria/index/assoc/HASHc011.dir/fig01a09.png>



*Legenda:* I. Local de acção da anfotericina B; II. Derivados de azóis; III. Equinocandinas

## 2. JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas tem sido uma grande ameaça nas últimas décadas para a população em geral, e especialmente para os indivíduos com comprometimento do seu sistema imune, onde a detecção de patógenos circulantes numa determinada região ou comunidade, e o conhecimento de suas características são de fundamental importância para desenvolver estratégias de tratamento, prevenção e controle da doença, possibilitando assim a prevenção de surtos graves antes mesmo que estes se estabeleçam<sup>34,37,38</sup>. Nos últimos anos, vem sendo observada uma disseminação global de certas variantes epidêmicas de microrganismos. Essa disseminação é frequentemente associada a uma maior virulência (vantagem adaptativa) ou a emergência de novas características de resistência a drogas, envolvendo invariavelmente um aumento da morbidade e mortalidade pelas doenças associadas<sup>3,4,39</sup>.

A pneumocistose (PCP) tem sido as causas de infecção em pacientes com AIDS, e tem merecido especial atenção para o seu diagnóstico, embora sua incidência em países desenvolvidos tenha declinado, resultante da profilaxia e terapia antirretroviral inclusiva, situação esta não existente em países em via de desenvolvimento, onde ainda encontramos uma baixa cobertura no TARVc, além disso, o uso indiscriminado de cotrimoxazol em pacientes infectados com HIV pode levar a um aumento na resistência a *P. jirovecii* a este fármaco<sup>36,40</sup>.

Não obstante a isso, existem dados que apontam na população africana para uma prevalência em torno de 51%, de pneumonias causados por *Pneumocystis*<sup>22,23</sup>, e em particular em Moçambique, onde em estudos prévios a prevalência foi de 19% (dados não publicados), não existindo estudos posteriores sobre a prevalência actual de PCP, nem sobre a Histoplasmose no país, diferente do demonstrado em pacientes imunocomprometidos pelo HIV na África do Sul, Zimbabwe, Uganda e Tanzânia<sup>17,25,36</sup>, países estes que fazem fronteira com Moçambique, com livre acesso entre os moradores das mais diferentes localidades. Este poderia ser considerado um fator de risco para a aquisição de *P. jirovecii* já que o contágio se dá por pessoa-pessoa. Também, as semelhanças climáticas e geográficas entre os países relacionados acima falam a favor da presença de *H. capsulatum* em nosso país, e conseqüentemente a ocorrência de infecção por este fungo em hospedeiros suscetíveis, entre eles seres humanos.

Por outro lado a histoplasmose tem apresentado grande relevância nos últimos anos, principalmente pela baixa de imunidade da população bem como por sua alta taxa de morbidade e

mortalidade. O seu diagnóstico ainda apresenta limitações, uma vez que a identificação do fungo através de exames diretos em material biológico é praticamente inviável, e os testes sorológicos apresentam taxas relativamente altas de resultados falsos negativos, além de necessitarem sensibilização prévia do sistema imunológico do indivíduo e uma resposta imune adequada. Nesse contexto, não devemos deixar de lado o facto de que no nosso país, o número de pacientes com HIV e AIDS tende a aumentar condicionando a existência da PCP e das infecções por Histoplasmose, o que comprometeria o objectivo da OMS para concretização dos 90-90-90. E que mesmo conseguido o alcance dos 90-90-90, ajudaria em casos de falha terapêutica a controlar as patologias oportunistas. Esta existência é corroborada pela informação de um estudo secundário retrospectivo não publicado, realizado no laboratório de Anatomia Patológica, por Abdimingo (comunicação pessoal), que revelou a presença de fungos por métodos histopatológicos (sem distinção da espécie) em pulmões dos pacientes HIV positivos em autopsias.

Métodos usados rotineiramente baseados no cultivo dos agentes etiológicos destas infecções apresentam limitações nos seus procedimentos. Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas à epidemiologia e diagnóstico das infecções fúngicas, bem como na taxonomia de seus agentes etiológicos.

A introdução da PCR para diagnósticos microbiológicos passou a ser uma valiosa alternativa aos métodos tradicionais, no que concerne a rapidez, bom limite de detecção, especificidade e potencial para otimização, que são as maiores vantagens deste método em relação às técnicas convencionais<sup>14,36</sup>. Ensaio utilizando a *nested* PCR para o diagnóstico de PCP e Histoplasmose realizados em diversos países mostraram resultados bastante satisfatórios, uma vez que a técnica apresenta excelente sensibilidade e especificidade<sup>13,14,41</sup>.

Devido à ausência de estudos sobre PCP e Histoplasmose no país, bem como o crescente aumento do número de pessoas sendo diagnosticadas HIV positivas, e que não se beneficiam do TARV que leva a cabo este estudo, para conhecermos a frequência destas micoses nos adultos HIV positivos do HCM.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a ocorrência da pneumonia por *H. capsulatum* ou *P. jirovecii* em doentes infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique.

#### **3.2 Objectivos específicos**

- ✓ Caracterizar demograficamente os pacientes recrutados no Hospital Central de Maputo
- ✓ Determinar a frequência da pneumonia por *H. capsulatum* ou *P. jirovecii* em pacientes com AIDS em uma população determinada do HCM.
- ✓ Determinar a frequência de coinfeções por *H. capsulatum* e *P. jirovecii*.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Desenho e local de estudo**

Este é um estudo transversal, realizado no Departamento de Medicina Interna do Hospital Central de Maputo onde é feito as coletas de amostras e depois enviadas ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane (FM-UEM). O Hospital Central de Maputo esta situado na Cidade de Maputo, Bairro Central, entre as Avenidas Eduardo Mondlane, Salvador Allende, Tomás Nduda e Agostinho Neto. É um Hospital de nível quaternário, o mais diferenciado do país. Possui uma capacidade de cerca de 1.500 leitos distribuídos por seis departamentos clínicos e uma unidade de cuidados intensivos, sendo o departamento de Medicina, onde no qual os pacientes com insuficiência respiratória ou com suspeita de doença fúngica disseminada são internadas. Serve directamente a uma população de 1.684.142 habitantes da cidade de Maputo e Matola.

### **4.2 População e amostra do estudo**

Neste estudo foram incluídas 50 pacientes, dos quais cada um forneceu uma amostra de lavado bronquio-alveolar (LBA), totalizando 50 amostras colhidas, todos eles imunocomprometidos pelo HIV, com insuficiência respiratória e suspeita de pneumonias causadas por fungos indicados pelos médicos pneumologistas nas enfermarias de Medicina Interna e da sub-especialidade de Pneumologia (Anexo 1 e 2). A escolha do N de 50 amostras foi por conveniência.

### **4.3 Critérios de inclusão e exclusão**

#### **4.3.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos no estudo, amostras dos pacientes com idade  $\geq 15$  anos, cujo resultado do teste rápidos *Abbott Determine e Unigold* fossem positivos, com CD4  $< 200$  células/ $\mu\text{L}$ , que apresente sintomas ou sinais de insuficiência respiratória causado por fungos e os admitidos ao

Serviço de Medicina do HCM para assistência médica continuada por apresentar um quadro de insuficiência respiratória aguda.

#### **4.3.2 Critérios de exclusão**

Não foram incluídos doentes infectados por HIV, internados por pneumonia, que não consentiram em participar no estudo.

#### **4.4 Diagnóstico clínico**

Para o diagnóstico foram utilizados dados clínicos e laboratoriais (Anexo 1,2,3), onde para o diagnóstico clínico presuntivo, foram consideradas a história clínica-epidemiológica compatível com pneumocistose e histoplasmose segundo os requisitos propostos no critério de classificação de histoplasmose baseado no consenso europeu EORT/MSG.

Para a presunção 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 (anexo 7).

#### **4.5 Coleta de amostra pulmonar e procedimentos para o diagnóstico laboratorial**

##### **4.5.1 Procedimentos para coleta de amostras biológicas**

Para os pacientes que reuniam os critérios de inclusão e que aceitaram participar no estudo mediante a assinatura de termo de consentimento informado e esclarecido e dos consentimentos necessário para exames laboratoriais (Anexo 2,3,4, 5), foi coletada uma amostra de 10 ml do LBA adicional para esse estudo; além das destinadas a rotina para pacientes com insuficiência respiratória submetidos a fibro-broncoscopias nos Exames Especializados do HCM. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da FM-UEM (em colman com gelo seco) onde foram estocadas em congelador a -20°C para posterior realização dos exames de

observação directa pelo Gram e Gimsa, técnicas histopatológicas (200µl) e testes moleculares (200µl) pela reacção em cadeia de polimerase aninhada (nested *PCR*).

#### **4.5.2 Observação Directa**

A observação directa foi com baseada nos protocolos tradicionais usando a técnica de coloração de Gram e Gimsa associado a técnica de Grocott.

##### **4.5.2.1 Técnica de Gram**

Este método foi descoberto por Christian Joachim, para coloração de bactérias em 1884, onde se conseguiu separa-las a partir da coloração apresentadas após o tratamento com certos agentes químicos. O método consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço de espécime clínico, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fuscina básica. Após a coloração e sucessivas lavagens, as que adquiriram a coloração azul violeta são chamadas gram-positivas e a que apresentarem a cor vermelha são gram-negativas. Os fungos são gram-positivos, portanto espera-se que tomem a cor azul violeta ou violeta escuro, o que se consideraria positivo este resultado<sup>41,42</sup>.

##### **4.5.2.2 Técnica de Giemsa**

Esta técnica consiste na fixação do LBA pelo álcool metílico, coberto pelo corante de Giemsa (preparado na hora, misturando 1 ou 2 gotas de solução de Giemsa para 1 gota de água destilada) durante 20 a 30 minutos, e secagem a temperatura ambiente. Posteriormente, examinar directamente sob lente de imersão.

##### **4.5.2.3 Método de Grocott (Impregnação pela Prata-Metanamina)**

Todas amostras foram tratadas previamente e fixadas em *cell block* (etanol 100%, formaldeído e ácido acético), em seguida fixadas em lâminas de microscopia com álcool a 95%, e imersas em ácido crómico por 10 minutos (para promover a oxidação das estruturas celulares), e lavadas com água filtrada. Em seguida as lâminas fixadas foram cobertas com metabissulfito de sódio a 1%, com vista a retirada dos excessos do ácido crómico e posteriormente lavadas novamente a água corrente filtrada. Em seguida as lâminas foram então banhadas em solução de nitrato de prata-metanamina 50%, aquecida a 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 posteriormente contra coradas com corante verde luz durante 3 minutos (para criar um contraste de cor com a prata) onde o fundo ficaria esverdeado e as estruturas celulares acastanhadas ou preto claro, e clareadas com diversas concentrações de etanol (70% e 95%), xilol e montadas usando Bálsamo do Canada e observadas ao microscópio óptico com a objectiva de 400 x.

### **4.5.3 Detecção por Métodos Moleculares**

#### **4.5.3.1 Extração de DNA das Amostras de LBA (Anexo 6)**

Para a extração do DNA foi usado o kit comercial QIAamp DNA mini kit da QIAGEN, seguindo as recomendações do fabricante, cujo o protocolo se apresenta no Anexo 8. Para tanto, em 200ul de amostra de LBA foram realizadas 5 etapas: a lise celular com tampão, precipitação e degeneração de proteínas inibidoras da PCR bem como a concentração do DNA pela proteinase K, absorção do DNA em colunas de sílica, lavagens para eliminação de resíduos contaminantes com tampões AW1 e 2, eluição do ácido nucleico através do tampão de eluição AE constituído por 1mM Tris-HCL, 0,5 Mm EDTA e ph 9,0.

#### **4.5.3.2 PCR para $\beta$ -globina Humana**

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  $\beta$ -globina humana. O resultado esperado é a presença de positividade 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 como mostra a

Tabela 2. Sequência de primers utilizados na PCR para detecção da região parcial do gene da  $\beta$ -globina humana.

Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de *primers* utilizados na PCR para detecção da região parcial do gene da  $\beta$ -globina humana.

PCR	<i>primer</i>	Sequência	Detecção
<b>Direta</b>	$\beta$ globF	5'-GCAAGAAAGTGCTCGGTGC-3'	$\beta$ -globina
	$\beta$ globR	5'-CACTCAGTGTGGCAAAGGTG-3'	

#### 4.5.3.3 PCR aninhada (*nested PCR*)

A PCR aninhada (*nested PCR*) é definida por usar duas reações com dois pares de *primers* distintos, sendo um externo (primeira reação) e outro interno (segunda reação), desenhados para uma sequência previamente definida dentro da primeira amplificação visando aumentar a especificidade e a sensibilidade da técnica. A primeira reação usa o DNA como molde, e a segunda usa o *amplicom* da primeira reação, de modo a amplificar ainda mais a região alvo. As amplificações foram realizadas em iCycler Thermal Cycler-BIO RAD / Dual-Block. Os tipos de PCR, o gene-alvo, os iniciadores (*primers*) e as condições de amplificação para cada sistema utilizado encontra-se descrito na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**3 e 4 utilizando Taq NA polimerase (Applied Biosystems).

Tabela 3. Primers utilizados para amplificar a sequência do gene mtLSrRNA de *P. jirovecii*, e predicta 100kDa de *H. capsulatum* na *nested* PCR

PCR	Gene	Primer	Sequencias 5'-3'	Pb *	Ref
<b><i>Histoplasma capsulatum</i></b>					
<b>Aninhada</b>	100kDa	HCI	gcgttccgagcctccacctaac	391	Bialek et al, (2002)
		HCII	atgtcccatcgggcgccgttagt	210	
		HCIII	gagatctagtcgcggccaggtca		
		HCIV	aggagagaactgtatcggtggctg		
<b><i>Pneumocystis jirovecii</i></b>					
<b>Aninhada</b>	mtLSUrRNA	pAZ 102-E	gatggctgttccaagccca	346	Wakefield et al,(2002)
		pAZ 102-H	gtgtacgttgcaaagtactc	290	
		pAZ 102-X	gtgaaatacaaacggactagg		
		pAZ 102-Y	tcacttaatattaattggggag		

Tabela 4. Condições dos ciclos térmicos aplicadas nas *nested* PCR

PCR	Reação	Condições de amplificação		Ciclos
<b><i>P. jirovecii</i></b>	1°	Desnaturação	94°C por 1,5 min	<b>40</b>
		Pareamento	60°C por 1,5 min	
		Extensão	72°C por 2 min	
	2°	Desnaturação	94°C por 1,5 min	<b>40</b>
		Pareamento	61,7°C por 1,5 min	
		Extensão	72°C por 2 min	
<b><i>H. capsulatum</i></b>	1°	Desnaturação inicial	94°C por 5 min	<b>35</b>
		Desnaturação	94°C por 30s	
		Pareamento	65°C por 30s	
		Extensão	72°C por 1 min	
		Extensão final	72°C por 5 min	
	2°	Desnaturação inicial	94°C por 5 min	<b>35</b>
		Desnaturação	95°C por 30s	
		Pareamento	67°C por 30s	
		Extensão	72°C por 1 min	
		Extensão final	72°C por 1 min	

#### 4.5.3.4 Controle de Qualidade

Após extração de DNA o primeiro passo foi descartar a possibilidade de existência de inibidores de reação. Uma vez observado positividade para o gene constitutivo humano, através da PCR da  $\beta$ -globina humana, provando a não existência de inibidores da PCR; as amostras foram testadas pela *nested* PCR para ambos os agentes previamente mencionados. Para todas as PCR realizadas foram incluídos controles positivos e negativos em conjuntos com as amostras testadas.



## **5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este protocolo e outros documentos de suporte (consentimento informado e questionário de estudo) foram submetidos aos seguintes Comitês de Bioética: Comitê Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina e do HCM e ao Comitê Ético do IHMT-UNL e ao Comitê Nacional de Bioética em Saúde com aprovação nº 168/CNBS/2015 (Anexo 4). Além disso, este projecto estabeleceu 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 projecto. As informações das pacientes presentes nos processos somente foram acessadas por médicos envolvidos do HCM. Todos os colaboradores dos referidos hospitais e do INI assinaram um termo de compromisso assegurando a confidencialidade das informações referentes à utilização dos procedimentos da instituição no âmbito profissional, na prestação do serviço e atendimento aos clientes, conforme o Decreto-lei 2848 de 07/09/1940 e Código Civil Brasileiro Lei 10406 de 10/01/2002. Não serão citados nomes, números de processos ou similares em nenhuma publicação.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características clínico-demográficas dos pacientes

Durante o recrutamento no Hospital Central de Maputo, foi possível obter 50 amostras, sendo 26 (52%) provenientes de projeto de pesquisa sobre PCP e 24 (48%) do projeto de Sarcoma de Kaposi (SK), onde a média das idades foi de 36,38 [IQR: 25-75; onde a idade mínima foi de 15 e Máxima de 72 anos] (Tabela 5). A maior parte dos pacientes eram do sexo feminino (60%), na faixa etária dos 15 aos 39 anos de idade e 80% dos pacientes são não fumantes tal como mostra a Tabela 5. Das amostras do estudo de PCP obtivemos 28 (58%) positivos para *H.capsulatum* e 18 (36%) para *P.jirovecci*, enquanto as amostras provenientes do estudo SK teve 30% de positivities para *H.capsulatum* e 20% *P.jirovecci* (Tabela 6).

Tabela 5. Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo (n= 50)

Variáveis	N	%	
Sexo	Feminino	30	60
	Masculino	20	40
Facha Etária	15-31	20	40
	32-39	18	36
	40-72	12	24
Tosse	Positivo	18	36
	Negativo	32	64
Febre	Positivo	33	66
	Negativo	17	34
Fumo	Fumante	10	20
	N fumante	40	80
TARV	Em TARV	38	76
	Sem TARV	12	24
Infiltrado Intersticial	Com infiltrado	46	92
	Sem infiltrado	4	8
Hipoxemia	Positivo	23	46
	Negativo	27	54
Profilaxia Contra PCP	Positivo	23	46
	Negativo	27	54
Dispneia	Positivo	23	46
	Negativo	27	54
Perda de Peso	Positivo	10	20
	Negativo	40	80
	Negativo	40	80

Tabela 6. Resultados dos métodos laboratoriais

Diagnóstico Direto				
<b>Observação Direta (Gram e Giemsa)</b>	Positivo	10	20%	
	Negativo	40	80%	
Diagnóstico Molecular				
<b>Nested PCR</b>		Positivo	29	58%
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Negativo	21	42%
		Positivo	19	38%
	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Negativo	31	62%
	Coinfecção	Positivos	11	22%

Nas características clínicas dos pacientes, encontramos predominância de pacientes com febre em 66% dos casos, infiltrado intersticial visto pela radiografia do tórax em 92% de casos, e 76% dos casos apresentavam perda de peso, 18% tinham tosse, 42% apresentavam hipoxemia, e 46 % estavam em profilaxia contra PCP e a mesma percentagem com dispneia. A maioria dos pacientes estavam em tratamento antirretroviral (76%). Sendo a condição geral dos pacientes incluídos no estudo, serem HIV positivos, houve a necessidade e estabelecer um cruzamento entre as características demográficas e clínicas e o TARV, porém não houve diferenças estatisticamente significativas tal como mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Características demográficas e clínicas dos pacientes em TARV.

Características		Total n (%)	TARV		p (value)*
			Sim (%)	Não (%)	
<b>Sexo</b>	Masculino	20 (40)	15 (75)	5 (25)	1,000
	Feminino	30 (60)	23 (76.7)	7 (23.3)	
<b>F. etária</b>	15-31	20 (40)	12 (60)	8 (40)	0,106
	32-39	18 (36)	16 (88.9)	2 (11.1)	
	40-70	12 (24)	10 (26.3)	2 (16.7)	
<b>Fumo</b>	Fumante	10 (20)	7 (70)	3 (30)	0,686
	Não	40 (80)	31 (77.5)	9 (22.5)	
<b>Tosse</b>	Sim	18 (36)	14 (36.8)	4 (33.3)	0,570
	Não	32 (64)	24 (63.2)	8 (7.7)	
<b>Febre</b>	Sim	33 (66)	23 (60.5)	10 (83.3)	1,181
	Não	17 (34)	15 (39.5)	2 (16.7)	
<b>Infiltrado</b>	Sim	46 (92)	34 (74)	12 (26)	0,560
	Não	4 (8)	4 (100)	0 (0)	
<b>Hipoxemia</b>	Sim	21 (42)	15 (71)	6 (29)	0,520
	Não	29 (58)	23 (79.3)	6 (20.7)	
<b>Profilaxia</b>	Sim	23 (46)	20 (87)	3 (13)	0,094
	Não	27 (54)	18 (66.7)	9 (33.3)	
<b>Dispneia</b>	Sim	23 (46)	17 (73.9)	6 (26.1)	0,750
	Não	27 (54)	21 (77.8)	6 (22.2)	
<b>Emagrecimento</b>	Sim	38 (76)	29 (76.3)	9 (23.7)	1,000
	Não	12 (24)	9 (75)	3 (25)	

\* $p < 0,05$ .

## 6.2 Factores de risco a PCP

Na 8 apresentamos as características demográficas e clínicas dos pacientes com suspeita clínica de PCP, onde pode ser sugerido que algumas características clínicas estão associadas a doença e outras constituem um factor de risco. Observa-se, o Fumo apresenta o valor de  $P$  significativo ( $p < 0.05$ ), que segundo o *Odds Ratio (OR)* nos mostra que indivíduos fumantes

apresentam chances 2 vezes maior de contrair pneumocistose em relação aos não fumantes, embora o intervalo de confiança seja muito largo. O sexo apresentou um nível de significância muito próximo a 0,05, porém o OR baixo, o que sugere que ser do sexo feminino é um factor protector, e com um intervalo de confiança bastante significativo, o que nos remeta a olhar para o sexo e o fumo como factores de risco.

Tabela 8. Características demográficas e clínicas dos pacientes com PCP

<i>Características</i>		<i>P.jirovencii</i> n (%)	ORb	IC95%	p value	ORa	IC95%	p value
<b>Sexo</b>	Masculino	8/20 (40.0)	Ref.					
	Feminino	11/30 (36.7)	0.868	0.253-2.999	0.054	0.571	18.56-2.030	0.812
<b>F. etária</b>	15-31	11/20 (55)		0.947-1.442	0.116	12.34	12.333-25.553	0.888
	32-39	4/18 (22.2)		0.145-2.882	0.116	2,246	11.678-10.267	0.235
	40-70	4/18 (33.3)	Ref.					
<b>Fumo</b>	Fumante	5/10 (50)	2,431	0.381-9.333	0.049	0.738	16.375-21.236	0.382
	Não F.	14/40 (35.0)	Ref.					
<b>Tosse</b>	Sim	9/18 (50)	2.071	0.655-8.065	0,627	0.185	46.980-0.331	0.190
	Não	10/32 (31.2)	Ref.					
<b>Infiltrado</b>	Sim	17/46 (37,0)	0.691	0.125-2.750	1.000	2.320	22.157-29.744	0,606
	Não	2/4 (50,0)	Ref.					
<b>Hipoxemia</b>	Sim	8/21 (38.1)	1.007	0.292-3.690	0.000	1.009	0.187-46.751	0,006
	Não	11/29 (37.9)	Ref.					
<b>Dispneia</b>	Sim	7/23 (30.4)	0.295	0.139-1.891	0.387	2.366	1.537-5.734	0.309
	Não	19/27 (38.0)	Ref.					

Legenda: Orb: Odds ration bruto; Ora: Odds ration ajustado, \*p<0.05

### 6.3 Factores de risco relacionada a Histoplasmosse

As características demográficas e clinicas dos pacientes com suspeita de *H. capsulatum*, onde podemos ver o sexo como um factor de risco, onde segundo o OR os indivíduos do sexo feminino tem 3 vezes maior chance de contrair histoplasmosse de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9. Características demográficas e clínicas dos pacientes com suspeita clínica de infecção por *H. capsulatum* recrutados no HCM.

<i>Características</i>		<i>H. capsulatum</i> n (%)	ORb	IC95%	<i>p</i> value	ORa	IC95%	<i>p</i> value *
<i>Sexo</i>	Masculino	15/20 (75.0)	Ref.					
	Feminino	14/30 (46.7)	3.429	0.992-1.854	0,052	1,268	0,062-1.268	0,098
<i>F. etária</i>	15-31	12/20 (60)	1.232	0.987-1.222	0.067	0.695	0.134-3.607	0.665
	32-39	10/18 (55.6)		0.245-2.672	0.330	0.994	0.156-6.346	0.995
	40-70	7/12 (58.3)	Ref.					
<i>Fumo</i>	Fumante	8/10 (80)	0,276	0.052-1.467	0.131	6.171	0.754-0.522	0.090
	Não F.	21/40 (52.5)	Ref					
<i>Tosse</i>	Sim	12/18 (41.4)	0.567	0.171-1.883	0,354	0.090	0.754-0.522	6.171
	Não	17/32 (53.1)	Ref.					
<i>Infiltrado</i>	Sim	26/46 (89,7)	2.308	0.223-3.886	0.483	0.736	0.237-7.671	1.349
	Não	3/4 (10,3)	Ref.					
<i>Hipoxemia</i>	Sim	11/21 (37.9)	1.488	0.477-4.644	0.494	1.055	0.252-4.424	0.942
	Não	18/29 (62.1)	Ref.					
<i>Dispneia</i>	Sim	16/23 (55.2)	0.406	0.127-1.303	0.130	3.750	0.855-6.451	0.080
	Não	13/27 (44.8)	Ref.					

Legenda: Orb: Odds ration bruto; Ora: Odss ration ajustado, \*p<0.05

#### 6.4 Sistema de pontuação e probabilidades de PCP dos pacientes participantes no estudo, de acordo com a classificação de pontuação de Smith, Forbes & Gazzaed (1992).

A Tabela 10 mostra as pontuações dadas as características relacionadas com os pacientes com suspeita de PCP. Como se pode notar a presença de infiltrados intersticiais no Rx do torax é um bom predictor de infecção por *Pj* e desenvolvimento de PCP.

Tabela 10. Probabilidade de PCP de acordo com pontuação final dos pacientes inclusos no estudo

Característica	Número de pacientes	Pontuação
Pontuação Inicial	50	+3
<b>Sintomas Clínicos</b>		
Sim	10	+6
Não	40	-9
<b>Sem profilaxia</b>		
Sim	23	+7
Não	27	-9
<b>Rx Tórax com infiltrados</b>		
Sim	47	+12
Não	03	-6
<b>Dessaturação</b>		
Sim	22	+9
Não	28	-13
<b>Possíveis pontuações</b>		-34 a +37

Na população estudada, de acordo com os dados clínicos dos pacientes, foi possível verificar que 3 pacientes apresentaram 4 factores preditivos, com 98% de probabilidade de ter PCP, 8 pacientes apresentaram 3 factores preditivos para PCP incluindo dessaturação com 87% de chance de ter PCP e 2 pacientes apresentaram 3 factores preditivos para PCP sem dessaturação, consequentemente com probabilidade de 82 % ter PCP (Tabela 11).

Tabela 11. Probabilidade de PCP de acordo com score final

Pontuação Final	Pacientes n (%)	% PCP
<-3	12 (6,5%)	<23
-3 a +6	22 (11,5%)	40-65
>+6	4 (1,5%)	82-87
>+19	12 (5,5%)	>98



Em geral, dos 16 pacientes que apresentaram probabilidades de ter PCP acima de 80%, 12 foram positivos na PCR, isto considerando os 3 valores preditivos incluindo dessaturação, sem deixar de lado os que se encontravam no intervalo de 40 a 65% (que também apresentavam probabilidades de serem positivos).

## **6.5 Resultados obtidos pelas técnicas de observação direta e moleculares (PCR).**

### **6.5.1 Observação direta pela coloração de Gram e Giemsa**

Na observação direta pela técnica de Gram e Giemsa, 20 % de amostras mostraram estruturas compatíveis com células fúngicas, 80 % foram negativas, sendo que, nestas foram observadas maiores quantidades de leveduras e bactérias sugestivas para cocos, diplococos e estreptococos. Foram observadas também algumas células cilíndricas, escamosas e macrófagos alveolares nas duas colorações (Tabela 6).

### **6.5.2 Histopatologia**

Embora todas as 50 amostras respiratórias tenham sido preparadas e coradas pela impregnação pela prata-metanamina para visualização de estruturas compatíveis com *H. capsulatum* e *P. jirovecii*, somente uma amostra aleatória (n=21) foi analisada. Estruturas compatíveis com células fúngicas foram observadas em 5 casos (MCS3, MCS7, MCS8, MCS30, MCS40), sendo que na Figura 5, demonstrativa de nossas análises, se observa estruturas impregnadas pela prata, arredondadas, com concavidades, ou semilunares compatíveis com *P.jirovecii*.

Figura 3. Registo fotográfico de estruturas compatíveis com *Pneumocystes jirovecii* em amostra de LBA em um caso suspeito, pela técnica de prata-metanamina de amostra respiratória de paciente com suspeita clínica de PCP. 1.000x.



### 6.5.3 Exames Moleculares

Após o processo de extração de DNA das amostras respiratórias, e posterior quantificação, foi observado que as concentrações obtidas foram satisfatórias (uma média de 150 ng/ul) para o desenvolvimento posterior da PCR. Realizou-se a PCR para o gene constitutivo humano que codifica a  $\beta$ -globina, como forma de verificar a presença ou ausência de inibidores de reação, onde todas as amostras amplificaram, ou seja, foram positivas, caracterizando assim, a não interferência de contaminantes inibidores da reação de PCR, bem como a integridade do DNA.

#### 6.5.3.1 Nested PCR

Para detectar a presença de *P. jirovecii* e *H. capsulatum* utilizando ácidos nucleicos em 50 amostras respiratórias de pacientes imunocomprometidos com pneumonias, foi utilizada nested PCR utilizando primers direcionados para a subunidade maior do RNA ribossomal mitocondrial (mtLSUrRNA) para detecção de *P. jirovecii* (Figura 6A) e região parcial de gene codificador da proteína 100 kDa em *H. capsulatum* (Figura 6B).

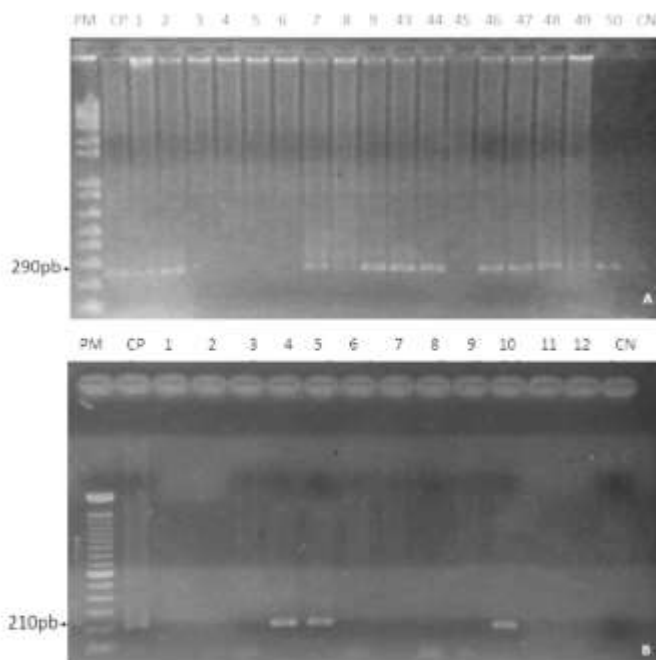
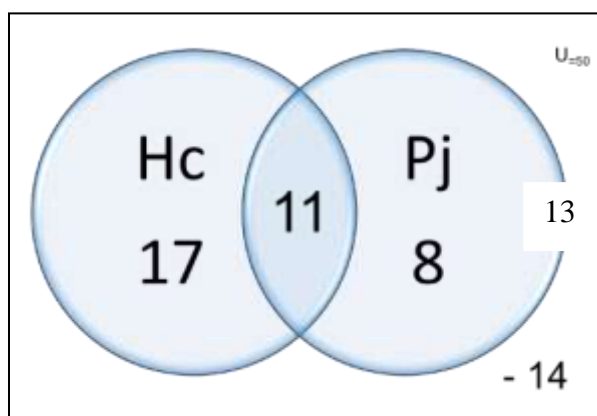


Figura 4. Padrão de bandas após eletroforese em gel de agarose a 1%. A) Fragmentos de DNA com 290 pb representativos de sequencia parcial do gene (mtLSUrRNA) do *P. jirovecii*. B) Fragmentos de 210 pb da sequência parcial do gene da proteína de 100kda (Hcp100) representativos de *H. capsulatum*

Dentre as amostras estudadas, 13 não apresentaram nenhuma amplificação, 08 (MCS7, MCS18, MCS22, MCS23, MCS43, MCS47, MCS48, MCS49) amplificaram somente fragmentos de DNA com 290 pares de base (pb) *P. jirovecii* e 17 (MCS3, MCS5, MCS6, MCS9, MCS12, MCS14, MCS15, MCS17, MCS21, MCS28, MCS30, MCS31, MCS34, MCS35, MCS37, MCS38, MCS40) amplificaram somente fragmentos de DNA com 210 pb *H. capsulatum*, também foram observadas amplificações dos dois genes, com fragmentos de 290 e 210 pb, em 11 amostras (MCS1, MCS2, MCS8, MCS16, MCS26, MCS29, MCS33, MCS39, MCS44, MCS45, MCS50) sugerindo co-infecção (Figura 7).

Figura 5. Diagrama de Venn representativo da ocorrência de PCP e histoplasmose na população estudada



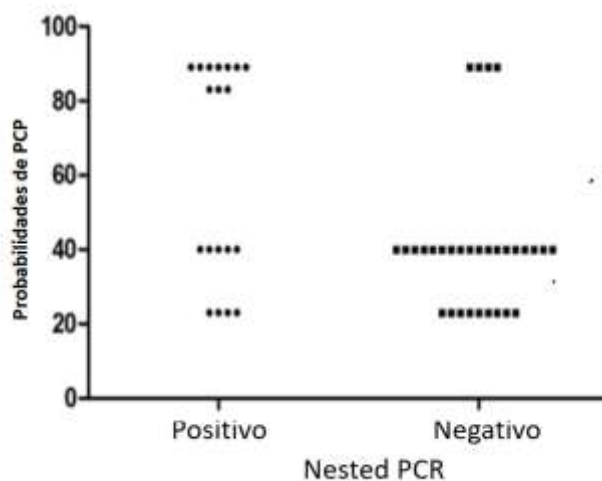
#### 6.5.4 Correlação entre os métodos laboratoriais

Não foi possível fazer uma comparação fiel entre as técnicas de coloração, as técnicas moleculares devido a adequabilidade das amostras clínicas empregadas no estudo. Entretanto entre as 21 amostras avaliadas tanto pela histopatologia bem como pela *nested* PCR, estruturas compatíveis com fungos foram observadas em 5 secções histológicas coradas pela prata-metanamina (MCS 3, MCS 30, MCS 40 positivas para *Histoplasma capsulatum*, MCS7 positiva para *Pneumocystis jirovecii* , MCS 8 co-infecção *Pj* e *Hc*) .

#### 6.5.4.1 Correlação clínico-laboratorial de pneumonia causada por *P.jirovecii* e *H. capsulatum*

A análise dos resultados obtidos no teste molecular associada a predição de PCP pelo sistema de probabilidades (*score*) demonstrou que 10 pacientes com probabilidade de 80% ou maior apresentaram PCRs positivos. A PCR também foi positiva em 5 pacientes na faixa entre 40-65% de probabilidade de desenvolver PCP e em 4 com probabilidade < 23% (Figura 8 e a Tabela 12).

Figura 6. Relação entre probabilidade de PCP de acordo sistema de pontuação proposto por Smith, Forbes & Gazzaed (1992) e resultados do teste molecular (nested PCR)



Na Tabela 12 podemos ver a relação entre os resultados do teste molecular e o sistema de probabilidades (*score*), onde vemos que nos 15 indivíduos que apresentavam forte probabilidade de ter PCP (>83%), aproximadamente 66% (n=10) foram positivos na PCR, 2 positivos pela observação directa e 5 apresentaram estruturas fúngicas na histopatologia, e os indivíduos que apresentavam menor probabilidade de ter PCP por *P. jirovecii*, mas com a clinica compatível com histoplasmose, foram positivos na PCR para *H. capsulatum* (16).

Tabela 12. Correlação entre os métodos laboratoriais para PCP por *P. jirovecii* e o sistema de probabilidade de score.

SCORE (n)	OD		PCR				Histopatologia		
	+	-	Pj*		Hc <sup>!</sup>		+	-	NR <sup>#</sup>
			+	-	+	-			
< 23 % ( 13)	3	10	4	19	6	7	0	2	11
40 a 65 %(22 )	4	19	5	17	10	12	3	5	14
83 > % ( 3)	0	3	3	0	2	1	0	1	2
>89%( 12)	2	9	9	3	10	2	2	3	7
<b>Total (50)</b>	9	41	19	31	28	22	5	11	34

\**Pneumocystis jirovecii*, <sup>!</sup>*Histoplasma capsulatum*, <sup>#</sup> Não realizado

## 6.6 Sequenciamento

Foram sequenciadas todas as amostras positivas, com objetivo de confirmar se os fragmentos gerados pela *nested* PCR eram específicos para as regiões alvos dos agentes etiológicos em questão. Foi possível identificar 100% de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* e, com 290 e 210 pares de bases respectivamente, tendo como regiões-alvo mtLSUrRNA para *Pj* e o gene codificador da proteína de 100kda de *Hc*.

## 7. DISCUSSÃO

Este estudo teve com principal objetivo avaliar o desempenho de métodos laboratoriais no diagnóstico de pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum*. Nossa casuística foi constituída por amostras respiratórias provenientes de 50 pacientes recrutados no Hospital Central de Maputo 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 cinquenta pacientes permitiu predizer 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.

Observando-se as manifestações clinico-demográficas, e comparando-as com outros estudos, em nossos pacientes houve maior predominância de febre em (66%) , em 92% dos casos observou-se infiltrado intersticial visto pela radiografia do tórax, e 76% dos casos apresentavam perda de peso, 18% tinham tosse, 42% apresentavam hipoxemia, e 46 % estavam em profilaxia contra PCP e a mesma percentagem com dispneia. Estes sinais e sintomas são comuns em doenças do trato respiratório com nível de imunocomprometimento do sistema imune<sup>41,43,44,45</sup>, porém são similares com os observados em vários estudos realizados com pacientes imunocomprometidos pelo HIV<sup>18,19,23</sup>, e que alguns estudos mostram que a presença de infiltrado seja um indicativo da doença<sup>15</sup>. Estudos feitos em pacientes imunocomprometidos para pesquisar *Aspergillus* usando lavado, observou-se maior predominância na 2 e 3 décadas de vida e com maior predominância de infiltrado<sup>46,47</sup>, dados estes similares aos observados neste estudo. A maioria dos pacientes estavam em tratamento antirretroviral (76%), situação similar a vários estudos publicados, onde em pacientes imunocomprometidos pelo HIV a maior reporte de infecções fúngicas oportunistas<sup>1,8,15,48</sup>, peso embora seja encontrado também em imunocompetentes, isso varia de acordo com a quantidade dos propágulos inalados, a virulência da cepa e do estado imune do hospedeiro, porem esta tem sido rara<sup>5,7</sup>.

Observou-se características demográficas e clinicas dos pacientes com suspeita clínica de PCP, onde pode ser como associadas a doença e outras como factor de risco, onde o Fumo apresenta o valor de  $p$  significativo ( $p < 0.05$ ), que segundo o de OR nas mostras, onde indivíduos fumantes apresentam chances 2 vezes maior de contrair PCP em relação aos não fumantes, estes

resultados são similares aos observados em vários estudos efectuados com pacientes HIV positivos e que alguns autores consideram o fumo como sendo um factor de risco<sup>13,22,27</sup>, e que fumar aumenta as chances de desenvolvimento de pneumonias, principalmente em imunocomprometidos<sup>1,48,19</sup>.

O sexo com um  $p$  muito próximo de 0,05, porem o OR baixo, sugere que ser do sexo feminino é um factor protector para a histoplasmose, e com um intervalo de confiança bastante significativo, estes resultados são similares com os observados em vários estudos<sup>7,34,35</sup>, e alguns autores relacionam isso com a ocupação dos homens, estão sujeitos a contacto com os propágulos de conídeos através da casa, construção e sujeitos a confinamentos trabalhando muitos em espaços minúsculos e por vezes pouco arejados<sup>30,28</sup>. Estudos feitos mostram maior prevalência de *H. capsulatum* e *P. jirovecii* em homens do que em mulheres, com uma proporção de 4:1<sup>43,44</sup>, porem neste estudo, este dado não foi o observado. Os homens tiveram menor positividade (23 casos positivos, sendo 8 apresentando *P. Jirovecii* e 15 com *H. capsulatum*), em relação a mulher (25 casos positivos, sendo 11 com *P. jirovecii*, e 14 com *H. capsulatum*). Essa diferença estava ligada a nossa amostragem, pois temos maior número de mulheres em relação aos homens, além de muitas das pacientes ao contrário dos homens, quando aparecia, apresentarem melhores condições para obtenção de LBA na enfermaria. Este aspecto pode estar ligado a função desempenhada pelos homens, em atividade laboral mais intensa que as mulheres e pouco tempo para procurar uma unidade sanitária, e quando o fazem geralmente em estado grave, enquanto as mulheres por serem mais preocupadas com a sua saúde, procuram sempre ajuda nas unidades sanitárias sempre que algo acontece, sem mencionar a vulnerabilidade em relação ao HIV<sup>16,27,34,49</sup>.

Considerou-se um factor de risco para histoplasmose a faixa etária e o sexo e presença de infiltrado pulmonar, dados similares com os já publicados, onde se faz menção de que a presença de infiltrado seria uma indicação da doença, o sexo e a idade pela ocupação laboral dos homens principalmente, já que são eles que trabalham em construções e outras atividades diretamente ligadas a manipulação de solos contaminados com *H. capsulatum*, tornando-os mais expostos aos propágulos infectantes dispersos no ar<sup>7,28,30</sup>

Os resultados da observação directa com coloração de Gram e Giemsa foram muito baixos, e está muito relacionado com a sensibilidade do método para detenção de fungos de algumas espécies, bem como a falta de sensibilidade dos métodos microscópicos<sup>50</sup> e a baixa celularidade das amostras. O facto de termos resultados de pontuação baixos ou altos e a *nested* PCR mostrar

resultados opostos, revela muita das vezes a sua sensibilidade e especificidade, visto que isto está ligado a capacidade da PCR apresentar resultados positivo até em casos de colonização, ou com a carga de infecção muito baixa, diferente da observação directa<sup>10,13</sup>. O paciente pode estar colonizado e não infectado, já que a técnica é bastante sensível, dando “positivo”, mesmo que a informação clínica não seja capaz de prever. Nesse sentido recomenda-se o cruzamento sempre que possível dos achados clínicos com o resultado de exames laboratoriais feitos para uma predição da doença acurada<sup>31</sup>. Entretanto, os resultados deste estudo são similares a alguns reportados na literatura especializada, pois muitos deles apresentam maior positividade em técnicas moleculares em relação a observação directa<sup>15,51</sup>.

No diagnóstico usando a *nested* PCR, das 50 amostras testadas, 8 (16%) foram positivas para PCP (região mitocondrial mtLSUrRNA), 18 (36%) positivas para histoplasmose (gene Hcp 100 que codifica a proteína de 100 kDa) e 11 (22%) apresentaram os dois patógenos (co-infecção), de acordo com estudos publicados usando a região mitocondrial mtLSUrRNA apresenta um bom desempenho, isto por causa do alto grau de conservação gênica desta região<sup>2,50</sup>. E o facto de *P. jirovecii* ter várias mitocôndrias em suas células, fazem com que a sensibilidade da *nested* PCR aumente, tornando assim o alvo molecular mais detectável, havendo assim a possibilidade de detecção de maior número de casos positivos para PCP, levando a técnica como recomendável<sup>21,23,28</sup>.

Os resultados da PCR em relação as outras técnicas de diagnóstico teve maior numero de positividade, sendo detectado entre as 50 amostras de LBA estudadas 29 casos com suspeita de histoplasmose e 19 com PCP. Este elevado indice de positividade deve-se ao facto da técnica utilizada ser muito sensível e especifica, e que mesmo com uma concentração baixa de DNA<sup>52</sup>, a *nested* PCR consegue ter resultados positivos<sup>13</sup>, onde já foi demonstrado que a sensibilidade da *nested* PCR pode ser 1.000 vezes maior que a PCR simples com uma eficiência de cerca de 100%<sup>13,21,33,34,14</sup>.

Embora não seja primeira vez que se descreve casos de co-coinfeções, vários estudos mostraram que os casos de co-infecção de vários patógenos simultaneamente ou de forma progressiva são comuns em pacientes com depressão do sistema imune<sup>15, 33,50,53</sup> como acontece com pacientes com insuficiências respiratórias e infecção por HIV, isto já foi descrito também entre humanos e outros animais<sup>54</sup>, sendo bastante comum a associação de *H. capsulatum*, *P.*



*Jirovecii* e *Citomegalovirus* em pacientes com HIV devido a similaridade das exigências em relação ao patógenos<sup>38,54,55</sup>, uma situação que já era esperada neste estudo pelo tipo de pacientes.

Relacionando com o sistema de probabilidades descrito por Smith, dos 15 pacientes considerados como preditivos de terem PCP por esse protocolo, 12 foram realmente positivos na PCR, dados similares aos observados por vários estudos publicados com amostras de lavado<sup>5,21,51</sup>, onde em um estudo com 40 amostras de LBA, das quais 11 apresentavam altas probabilidades de PCP, 10 apresentaram resultado positivo na PCR mostrando que o sistema de probabilidade é um método bastante eficaz para o prognóstico de PCP<sup>25</sup>. Os 3 casos restantes poderiam ser considerados como possíveis casos de colonização, situação já prevista e relatadas em varias publicações, fazendo menção que a PCR não faz a distinção entre colonização e infecção<sup>13,50</sup>.

## 8. CONCLUSÃO

- ✓ A frequência de *P. jirovecii* e *H. capsulatum* nos pacientes com aids recrutados no HCM foi de 16% e 34% respectivamente.
- ✓ A frequência de co-infecção (*H. capsulatum* e *P. jirovecii*) nos pacientes com aids recrutados foi de 22%.
- ✓ Pacientes adultos HIV positivos com infecção respiratória no HCM apresentam uma alta porcentagem de *H. capsulatum* e *P. jirovecii*, o que configura um problema de saúde pública.
- ✓ A pontuação clínica aumenta a probabilidade de suspeitar pacientes com *P. jirovecii* e ajuda no diagnóstico presuntivo da PCP.
- ✓ A técnica de *nested* PCR detectou maior número de casos em relação ao diagnóstico clínico e laboratorial convencional, o que mostra-se como uma técnica molecular recomendável para o diagnóstico laboratorial com uma alta sensibilidade, especificidade e eficiência.
- ✓ A combinação da pontuação clínica e as técnicas de *nested* PCR ajuda no estabelecimento do diagnóstico definitivo da PCP e da histoplasmose.
- ✓ É possível implementar a técnica de *nested* PCR no Hospital Central de Maputo, Moçambique

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. S, T. *et al.* Estudo da Incidência de Fungos Isolados de Amostras de Lavado Bronco Alveolar, Biópsia Transbrônquica e de Escarro. *Universidade Tecnol. Fed. Parana* v **6**, n **1**, (2016).
2. CL, 1. An, F, G. & G, H. A. 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* 71:2065–2070 (2003).
3. Organization, 50. World Health. Joint WHO/UNAIDS/UNICEF. *Glob. Burd. Dis.* (2014).
4. WHO, J. U. N. global-AIDS-update-2016\_en.pdf. (2016).
5. J, M., Thomas. Epidemiology, pathogenesis, and microbiology of community-acquired pneumonia in adults. *UpToDate* 2009 (2009).
6. Hoffmann, 14. E.R, Daboit, T. C., Paskulin, D. D. & Monteiro et al, A. . Disseminated Histoplasmosis in SIDA. (2014).
7. E, C. M., R, N., P, E. & F, V. M. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS: epidemiological, clinical, microbiological and immunological analysis of 26 patients [in Spanish]. *Enferm Emerg* 2004 6:8–15. (2004).
8. Carvalho, B. T. C., Víctor, N. & Magda Maria Sales Carneiro, S. Immune system and infections. *Jornal de Pediatria* Copyright © 1998 by Sociedade Brasileira de Pediatria (1998).
9. Chandwani, J., Vyass, N., Hooja, S., Sharma, B. & Maheshwari, R. *Mycological Profile of Sputum of HIV positive patients with lower respiratory tract infection and its correlation with CD4+ T Lymphocyte count.* (2015).
10. Gavronski, S., Botelho, T. K. R. & Cordova, C. M. M. Diagnóstico laboratorial de Fungos: Avaliação de Métodos Moleculares de detecção de antígenos. *RSAC.2016,48(2)96-0109*
11. N, G., K, A. S., A, R., R, N. & R, S. Histoplasmosis diagnosis and review of literature with special emphasis on differential diagnosis. **Volume 5**, p. 198–203 ;21:240–244 (2009).
12. G, V. *Molecular Diagnostics in Virology.* **Volume 2**, (2004).
13. Fungaro, M. H. P. PCR na Micologia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* (1999).
14. P, F. *et al.* Comparasion Between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosis Fungal Infection from LBA. *Veterinária Bras* 34, 637–642. (2004).

15. C, L. B. *et al.* Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory test. *Micol.* V 22 p. 141–146 (2005).
16. Borges, A. S., Ferreira, M. S., Silvestre, M. T. A., Nishioka, S. de A. & Rocha, A. Histoplasmoze Em Pacientes Imunodeprimidos: Estudo De 18 Casos Observados Em Uberlândia, Mg. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30(2):119-124, mar-abr, 1997. 30(2):119–124 (1997).
17. S, N., Frederick. Molecular Diagnostics for Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Community Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 47:S123–6 (2008).
18. Valero, c, Gago, S., Monteiro, M. ., Izequierdo, A. A. & Buetrago, (M. J. African Histoplasmosis: nwe clinical and Microbiological insights. *Medical Mycology* (2016).
19. A, M. & A, N. K. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol* 25(2): 297–317 (2012).
20. Esteves, F. *et al.* Clinical Relevance of Multiple Single-Nucleotide Polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: Development of a Multiplex PCR-Single-Base-Extension Methodology. *Journal Of Clinical Microbiology*, May 2011, p. 1810–1815 0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.02303-10 Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. (2011).
21. Orsi, C. F. *et al.* Detection of *Pneumocystis jirovecii* and *Aspergillus* spp. DNA in bronchoalveolar lavage fluids by commercial real-time PCR assays: comparision with convencional diagnostic tests. *Nwo Microbioloca*. 38.75-84 (2015).
22. Morris, A. *et al.* Current Epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia. *Emerging Infection Diseases*. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). (2004).
23. V, N., E, G., G, F. M., D, R. M. & W, D. D. Frequency of *Pneumocytis* in sputum from HIV and TB patients in Namibia. *J Infect Dev Ctries* 8(3): 7;65–79. (2014).
24. L, 7. Casanova-Cardiel & J, L. M. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol* 44:28S (1997).
25. Gazzard, S., Forbes,. Score Westminster Hospital, Dean ryle Street Horseleerry Road London SW1, UK. (1991).
26. A, K. C. Histoplasmosis. *Clin Chest Med*.v 30, N.2, p.217–225. (2009).
27. Hoffmann, E. da R. Histoplasmoze em pacientes portadores de HIV/AIDS em Porto Alegre, Brasil. (Universidade Federal De Ciências Da Saúde De Porto Alegre, 2016).

28. Costa, C. R., Luli, F. B. D., Carneiro, J. R. & Cardoso, A. M. Infecções Fungicas em pacientes HIV Positivos, Revisão da Literatura sobre Criptococose e Histoplasmoze. n4 p:843–854.2014 (2014).
29. J, L. *et al.* Histoplasmosis (epidemiology). *Infectious Diseases, division of Clinical Microbiology* (2016).
30. J, W. *et al.* Factors associated with severe manifestations of histoplasmosis in AIDS. *Clin Infect Dis* 30:877–81 (2004).
31. Reiss, E., Shadomy, H. J. & Lyon, G. M. *Fundamental Medical Mycology*. (2012).
32. R, T. Ferrarelli & Goulart, L. S. Classic histoplasmosis: Review. *275RBAC vol. 38(4)*, 275–279, (2006).
33. McKinsey, D. S. *et al.* Prospective Study of Histoplasmosis in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus: Incidence, Risk Factors, and Pathophysiology. *Clinical Infectious Diseases* 1997;24:1195–1203 q 1997 by The University of Chicago. All rights reserved. 1058–4838/97/2406–0027\$02.00 i (1997).
34. Kandi, V., Vaish, R., Palange, P. & Bhoomagiri, M. R. Chronic Pulmonary Histoplasmosis and its Clinical Significance: an Under-reported systemic Fungal Disease. *DOI.10.7759/CUREUS*, (2016).
35. Histoplasmoze no Rio Grande do Sul. Estudo descritivo com ênfase nas lesões pulmonares.
36. A, E. S. E. *et al.* Comparison of different methods to diagnose pneumocystis in children, with hematological malignancies. *Egyptian J of Med Microbiol* 17: 151–159 (2008).
37. Zarrinfar, H., Mirhendi, H., Fata, A. M., Khodadadi, H. & Kordbacheh, P. Detection of *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* in Bronchoalveolar Lavage Samples of Hematopoietic Stem Cell Transplants and Patients with Hematological Malignancies by Real-Time Polymerase Chain Reaction, Nested Polymerase Chain Reaction and Mycological Assays. *Jundishapur J. Microbiol.* **8**, (2014).
38. Zarrinfar, H. *et al.* Use of Mycological, nested PCR, and Real-time PCR Methods on BAL Fluids for Detection of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* in Solid Organ Transplant Recipients. *Mycopathologia* **176**, 377–385 (2013).
39. Organization, W. H. & others. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2015–2016: applicable as of 1 January 2015. (2015).

40. B, B. C. *et al.* Strain typing methods and molecular epidemiology of pneumocystis pneumonia. *Emerg Infect Dis* (2004).
41. DE SOUZA, C. M. D. Curso de Biomedicina Microbiologia Ii.
42. Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. & Svärd, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nat. Rev. Microbiol.* (2010). doi:10.1038/nrmicro2317
43. Camilo, F. & Mello, R. C. P. de. *doencas infecciosas parasitaria, guia do bolso*. Série B. Textos Básicos de Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde, 2010).
44. Carl, G. A. D. *Parasitologia Clínica*. (Atheneu).
45. R, N. T. *et al.* Risk factors for community-acquired pneumonia among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000 (181AD).
46. De Tomografia Computadorizada, D. A. R. Aspergilose E Candidíase Pulmonar Em Pacientes Imunocomprometidos–Estudo Comparativo Dos Achados. (Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006).
47. Mendonça, D. U. *et al.* Aspergilose pulmonar em paciente imunocompetente e previamente sadio. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**, 124–126 (2011).
48. Machado, P. R. L., Carvalho, L., Araújo, M. I. A. S. & Carvalho, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções Immune response mechanisms to infections\*. ©2004 by *Anais Brasileiros de Dermatologia* 79(6):647–664 (2004).
49. Belezerra, F. S. Histoplasmosse Infecção Em Pacientes Hiv/Aids Residentes Na Cidade De Fortaleza, Ceará. (Universidade Federal Do Ceará Faculdade De Medicina Departamento De Saúde Comunitária, 2009).
50. Machado, R. L. D. *et al.* Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da Giardia lamblia em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* **34**, 91–3 (2001).
51. Silva, F. almeida da. Desempenho de Metodos Laboratoriais no diagnostico de infeccoes fungicas pulmonares em pacientes do instituto nacional de infectologia evandro chagas. (2015).
52. Limper, A. H., Adenis, A., Le, T. & Harrison, T. S. Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect. Dis.* (2017). doi:10.1016/S1473-3099(17)30303-1
53. J, N. R., D, S. & ET AL, B. Histoplasmoses in Idaho and Montana.USA. *Emerg Infect* 2015 , 21 (5): 1071–2 (2012).

54. Histoplasmose em caes e gatos no Brasil. *Ver. Soc. Bras. Trop N*, p. 192–198 (2009).
55. R, M. L., L, W. N. & E, R. S. quantitative Real-time PCR for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *East Afr Med J* Feb;76(2):80–4 (2012).
56. Nucci, M. Infecções no hospedeiro imunodeprimido. (Universidade Federal do Rio de Janeiro).

## 10. APÊNDICE E ANEXOS

### APÊNDICE 1: Ficha de Seguimento Clínico

Protocolo do estudo: **Detecção Molecular de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* em pacientes infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique.**

Versão 03 de 28 de Maio de 2015

<b>I DADOS DEMOGRÁFICOS E DE ESTUDO</b>	
•	Data de recrutamento ao estudo (dd/mmm/aaaa)   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>
•	Data de hospitalização (dd/mmm/aaaa)   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>
•	Número de hospitalização (NID)   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>
	Número do participante no estudo   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>
•	Idade   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>
•	Sexo Masculino Feminino
•	Enfermaria onde está internado   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>
•	Número de cama   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>
<b>II CRITÉRIOS DE INCLUSÃO</b>	
• a	Doente HIV positivo com idade $\geq$ de 15 anos, com tosse $\geq$ 2 semanas e $\leq$ 6 semanas e duas das seguintes características clínicas:
b	História de febre? Sim Não
c	Hipoxémia (SatO <sub>2</sub> < 90% ou PO <sub>2</sub> $\leq$ 75mmHg) Sim Não
d	Radiografia do tórax com infiltrado intersticial bilateral Sim Não
•	Doente HIV internado com pneumonia sem agente isolado Sim Não
•	<b>Cumpe os critérios de inclusão se a resposta a pelo menos duas das alíneas no número 6 for “SIM” ou se a resposta ao numero 8 for “SIM”.</b> Sim Não
<b>SE “SIM”, CONTINUAR COM O QUESTIONÁRIO</b>	
<b>III HISTÓRIA PREGRESSA</b>	
•	O doente é fumador? Sim Não
•	O doente está sob imunomoduladores nos últimos 6 meses? Citostaticos Sim Não Corticoides Sim Não
•	O doente está em profilaxia para PcP? Sim Não Toma regular Sim Não
•	Regime profilático para PcP Cotrimoxazol Dapsona Clindamicina-primaquina Atovacona Nenhum Outro   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>   <input type="text"/>



•	O doente está sob TARV?	Sim Toma regular Sim À quantos dias	Não Não
•	Regime TARV	3TC+AZT+NVP 3TC+D4T+NVP 3TC+TDF+NVP 3TC+ABC+EFV 3TC+AZT+TDF+LPV/r Outro	3TC+AZT+EFV 3TC+TDF+EFV 3TC+ABC+NVP 3TC+TDF+LPV/r 3TC+TDF+SQV
<b>IV</b>	<b>HISTÓRIA DA DOENÇA ACTUAL</b>		
•	O doente tem história de febre ao internar?	Sim ≥ de 2 semanas Sim ≤ de 2 semanas Sim	Não Não Não
•	O doente tem história de tosse ao internar?	Sim ≥ de 2 semanas Sim ≤ de 2 semanas Sim	Não Não Não
•	O doente tem história de dificuldade ao respirar?	Sim	Não
•	O doente transpira muito à noite?	Sim	Não
•	O doente tem perdido de peso ≥ 3KG ≥ 4 semanas	Sim	Não
•	O doente tem diarreia?	≥ de 2 semanas ≤ de 2 semanas	Sim Não Sim Não Sim Não
<b>V</b>	<b>EXAME MÉDICO 1º DIA DE INTERNAMENTO</b>		
<b>Exame físico</b>			
•	Temperatura (° c)	.	
•	Frequência Respiratória (Ciclos por minuto)	≥ 20cpm Sim ≤ 20cpm Sim	Não Não
•	Dispneia (observada pelo examinador)	Sim	Não
•	Nódulos linfáticos aumentados	Sim	Não
<b>VI</b>	<b>Exames Laboratoriais</b>		
•	Teste de HIV/PCR-HIV conhecido?	Sim	Não
•	Qual é o resultado do teste de HIV?	Positivo Sim	Não
•	Oximetria do pulso (Sat.O2) %		
•	Pressão artéria de oxigénio (PO2) mmHg		
•	Desidrogenase lática (LDH) UI		

Qual é o resultado CD 4 cp/μL?	
--------------------------------	--

<b>VII</b>	<b>Raio X do tórax (RXT) com projecção pósterio-anterior</b>	
•	Radiografia feita	Sim Não
•	Data da realização da radiografia	_ _ / _ _ / _ _ _ _
•	Qualidade radiografia	Boa Sim Não Aceitável Sim Não Difícil leitura Sim Não Não legível Sim Não
<b>VIII</b>	<b>Achados da radiografia do tórax</b>	
	<b>PARÊNQUIMA PULMONAR</b>	
•	Parênquima pulmonar alterado?	Sim Não
•	Pulmão com alteração	Direito Esquerdo
•	Localização da alteração pulmonar	Superior Médio Inferior
•	Tipo de lesão pulmonar	Intersticial Consolidação Nodular Fibro-nodular Padrão Miliar Cavidades Paraquística Atelactasia Colapso
	<b>PLÉURA</b>	
•	Derrame pleural	Sim Não
•	Espessamento da pleura	Sim Não
•	Pneumotórax	Sim Não
	<b>MEDIASTINO</b>	
•	Adenopatia hilar/mediastínica	Sim Não
•	Derrame pericárdio	Sim Não
	<b>DATA DA PROXIMA VISITA</b>	
	Data  _ _ / _ _ / _ _ _ _	Ass.:
<b>IX</b>	<b>7º DIA DE SEGUIMENTO</b>	
•	Tem tosse?	Sim Não Tosse produtiva Sim Não Hemoptise Sim Não
•	Tem dificuldade respiratória?	Sim Não
•	Tem febre?	Sim Não
•	Tem sudorese nocturna?	Sim Não
	<b>Exame físico</b>	
•	Temperatura (° c)	_ _ . _
•	Frequência Respiratória (Ciclos por minuto)	≥ 20cpm Sim Não ≤ 20cpm Sim Não
•	Dispneia (observada pelo examinador)	Sim Não
•	Nódulos linfáticos aumentados	Sim Não

<b>X</b>	<b>Exames Laboratoriais</b>	
•	Oximetria do pulso (Sat.O2) %	_ _ _
•	Pressao artéria de oxigénio (PO2)mmHg	_ _ _
•	Desidrogenase latica (LDH) UI	_ _ _
<b>XI</b>	<b>Raio X do tórax (RXT) com projecção pósterio-anterior</b>	
•	Radiografia de controlo realizado?	Sim      Não
•	Data da realização da radiografia	_ _  /  _ _ _  /  _ _ _ _
•	Qualidade radiografia	Boa   Sim      Não Aceitável   Sim      Não Difícil leitura   Sim Não Não legível   Sim      Não
<b>XII</b>	<b>Achados da radiografia do tórax</b>	
	<b>PARÊNQUIMA PULMONAR</b>	
•	Parênquima pulmonar alterado?	Sim      Não
•	Pulmão com alteração	Direito      Esquerdo
•	Localização da alteração pulmonar	Superior      Médio      Inferior
•	Tipo de lesão pulmonar	Intersticial      Consolidação Nodular Fibro-nodular      Padrão Miliar Cavidades Padrão quística      Atelactasia Colapso
	<b>PLEURA</b>	
•	Derrame pleural	Sim      Não
•	Espessamento da pleura	Sim      Não
•	Pneumotórax	Sim      Não
	<b>MEDIASTINO</b>	
•	Adenopatia hilar/mediastínica	Sim      Não
•	Derrame pericárdio	Sim      Não
	<b>PATOLOGIAS ASSOCIADAS</b>	
•	Candidíase orofaríngea	Sim      Não
•	Sarcoma de Kaposi	Sim      Não
•	TB pulmonar	Sim      Não Data de confirmação laboratorial  _ _  /  _ _ _  /  _ _ _ _  Método diagnóstico   BK PCR
•	Outras	_ _ _ _ _ _ _ _   _ _ _ _ _ _ _ _ _   _ _ _ _ _ _ _ _ _ _   _ _ _ _ _ _ _ _ _

	<b>DATA DA PROXIMA VISITA</b>	____/____/____
	Data ____/____/____	Ass.:
<b>XIII</b>	<b>21º DIA DE SEGUIMENTO</b>	
•	Tem tosse?	Sim Não Tosse produtiva Sim Não Hemoptise Sim Não
•	Tem dificuldade respiratória?	Sim Não
•	Tem febre?	Sim Não
•	Tem sudorese nocturna	Sim Não
<b>Exame físico</b>		
•	Temperatura (° c)	____.____
•	Frequência Respiratória (Ciclos por minuto)	≥ 20cpm Sim Não ≤ 20cpm Sim Não
•	Dispneia (observada pelo examinador)	Sim Não
•	Nódulos linfáticos aumentados	Sim Não
<b>XIV</b>	<b>Exames Laboratoriais</b>	
•	Oximetria do pulso (Sat.O2) %	____
•	Pressao artéria de oxigénio (PO2)mmHg	____
•	Desidrogenase latica (LDH) UI	____
<b>XV</b>	<b>Raio X do tórax (RXT) com projecção pósterio-anterior</b>	
•	Radiografia de controlo realizado?	Sim Não
•	Data da realização da radiografia	____/____/____
•	Qualidade radiografia	Boa Sim Não Aceitável Sim Não Difícil leitura Sim Não Não legível Sim Não
<b>XVI</b>	<b>Achados da radiografia do tórax</b>	
<b>PARÊNQUIMA PULMONAR</b>		
•	Parênquima pulmonar alterado?	Sim Não
•	Pulmão com alteração	Direito Esquerdo
•	Localização da alteração pulmonar	Superior Médio Inferior
•	Tipo de lesão pulmonar	Intersticial Consolidação Nodular Fibro-nodular Padrão Miliar Cavidades Parao quística Atelactasia Colapso
<b>PLÉURA</b>		
•	Derrame pleural	Sim Não



## **APÊNDICE 2: Consentimento para a Realização de Fibrobroncoscopia com Lavado Broncoalveolar**

Protocolo do estudo: **Detecção Molecular de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* em pacientes infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique.**

*Versão 03 de 28 de Maio de 2015*

O que é Fibrobroncoscopia?

Como previamente explicado, este procedimento é necessário para a observação e colheita de amostras dentro das vias respiratórias. Para tal recorre-se ao uso de um aparelho chamado broncoscópio operado por Médicos especializados em problemas das vias aéreas (Médico Pneumologistas).

Quais são os riscos?

O procedimento é seguro e não acarreta grandes riscos ou efeitos adversos. Durante a passagem do aparelho pela orofaringe poderá sentir algum desconforto e sensação de falta de ar, mas o médico lhe dará instruções para que essa sensação passe.

Depois do procedimento, pelo efeito da anestesia poderá ter sensação de falta de ar mas sem nenhum comprometimento real da respiração. Igualmente, poderá ter tosse de pouca duração com eliminação de pequena quantidade de expectoração (escarro). Sonolência momentânea também poderá ocorrer por efeito dos sedativos.

Qual é o tempo de duração do procedimento?

A execução do procedimento normalmente dura entre 20 a 60 minutos dependendo do caso.

Quais são as precauções a tomar antes do procedimento?

É necessário que esteja em jejum (sem comer e nem beber) por pelo menos 8 horas antes do procedimento.

O que fazer em caso de surgimento ou agravamento de sintomas?

Em caso de se sentir mal ou notar agravamento dos sintomas decorrentes do procedimento, deve comunicara alguém da equipa médica que lhe assiste ou qualquer outro funcionário da enfermaria onde estiver internado. Prontamente terá assistência médica e todas as medidas necessárias serão tomadas.

O que devo fazer para participar deste estudo?

Se aceita a realização deste procedimento, solicitamos que nos dê a autorização mediante a assinatura do presente formulário de consentimento.

Declaração concordando na realização de fibrobroncoscopia:

*Eu li, ou foi-me lido este formulário de consentimento para a realização de fibrobroncoscopia com lavado broncoalveolar e foram-me explicados os propósitos do procedimento. Todas as minhas perguntas e dúvidas foram respondidas e eu livremente e voluntariamente aceito a realização do procedimento:*

\_\_\_\_\_ *Sim, eu aceito a realização de fibrobroncoscopia com lavado broncoalveolar.*

.....

Nome do Participante

.....

Assinatura do Participante

Data: ..... / ..... / .....

.....

O Médico

Data: ..... / ..... / .....

### **APÊNDICE 3: Consentimento para Indução da Expectoração**

Protocolo do estudo: **Detecção Molecular de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* em pacientes infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique.**

*Versão 03 de 28 de Maio de 2015*

O que é Indução da Expectoração

Como previamente explicado, é um procedimento para obtenção da expectoração nas pessoas que não a podem eliminar espontaneamente e/ou em quantidade suficiente para a análise.

Como é feito o procedimento?

O procedimento é feito recorrendo-se a um aparelho que transforma líquidos em pequenas partículas em forma de vapor capazes de serem inspiradas. Dependendo do caso, o médico irá lhe pedir para inalar um medicamento (salbutamol) através de uma pequena bomba para permitir a abertura das vias aéreas respiratórias.

Quais são os riscos do procedimento

Poderá sentir algum desconforto respiratório e episódios de tosse.

Quanto tempo dura o procedimento?

A execução do procedimento normalmente dura entre 10 a 30 minutos dependendo do caso.

Quais são as precauções a tomar antes do procedimento?

Não será necessário tomar nenhuma precaução antes de fazer o procedimento.

O que fazer em caso de surgimento ou agravamento de sintomas?

Em caso de se sentir mal ou notar agravamento dos sintomas, deverá comunicar alguém da equipa médica que lhe assiste ou qualquer outro funcionário da enfermaria onde estiver internado.

Prontamente terá assistência médica e todas as medidas necessárias serão tomadas.

O que devo fazer para realizarem este procedimento?

Se aceita a realização deste procedimento, solicitamos que nos dê a autorização mediante a assinatura do presente formulário de consentimento.

Declaração concordando na indução da expectoração:

*Eu li, ou foi-me lido este formulário de consentimento para a indução de expectoração e foram-me explicados os propósitos do procedimento. Todas as minhas perguntas e dúvidas foram respondidas e eu livre e voluntariamente aceito a realização do procedimento:*



\_\_\_\_\_ *Sim, eu aceito a realização indução de expectoração.*

.....  
Nome do Participante

.....  
Assinatura do Participante

Data: ..... / ..... / .....

.....  
O Médico

Data: ..... / ..... / .....

## **APÊNDICE 4: Declaração de Consentimento Informado**

Protocolo do estudo: **Detecção Molecular de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* em pacientes infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique.**

*Versão 03 de 28 de Maio de 2015*

A Pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* afecta os pulmões de seres humanos com deficiente capacidade de defesa contra as infecções. Os indivíduos com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que não estejam a tomar Trimetoprim-Sufametoxazol (normalmente conhecido por cotrimoxazol), **antifúngicos** e medicamentos contra a aids (terapêutica antiretroviral de combinação - TARVc), podem desenvolver a doença. Esta pneumonia é caracterizada por tosse, dificuldade de respirar, febre, suores nocturnos e perda de peso. A identificação do agente causador desta doença é importante para a escolha do medicamento correcto. Por isso, com este estudo poderemos entender melhor o comportamento desta doença e assim contribuir para melhor elaborar os planos de controlo e prevenção desta pneumonia.

Para a melhor entendermos esta doença, foi elaborado o presente estudo.

### **1. Procedimento**

A participação no estudo implica que sejam recolhidos 15 ml (o equivalente a três colheres de chá) das secreções pulmonares. Para a recolha deste produto poderá ser submetido a um de dois procedimentos, nomeadamente a indução da expectoração ou broncoscopia com lavado broncoalveolar.

Indução da expectoração

É um procedimento indicado para obtenção da expectoração. Para tal utiliza-se um aparelho para espalhar líquido em forma de vapor (aerossol) em torno da boca e do nariz através de uma máscara transparente.

Broncoscopia com lavado broncoalveolar

Para realizar o lavado broncoalveolar você será conduzido para uma sala apropriada. Em seguida, o médico aplicará um medicamento na sua orofaringe (garganta) e um medicamento sedativo através da veia com objectivo de diminuir a sua ansiedade e desconforto facilitando a realização

do procedimento. O médico irá colocar um pequeno tubo de oxigénio na sua narina. Depois, ser-lhe-á introduzido pelo nariz ou pela boca um tubo de pequeno diâmetro até aos brônquios permitindo a observação das vias respiratórias. Mais tarde, será introduzido soro fisiológico na região afectada do pulmão e de seguida o soro será totalmente aspirado pelo aparelho.

Uma amostra de expectoração será analisada no laboratório de microbiologia da Faculdade de Medica da Univeraidsde Eduardo Mondlane. Depois da análise, uma parte dela será enviada para Intituto de Higiene e Medicina Tropical da Univeraidsde Nova de Lisboa *especialmente* para o estudo da genética de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum*.

2. O que vai acontecer consigo se aceitar participar nesta pesquisa:

Se aceitar fazer parte do estudo, serão feitas algumas perguntas sobre os medicamentos que tomou até agora (não se preocupe se não se lembrar exactamente dos nomes). Posteriormente você será encaminhado para a indução da expectoração ou para a broncoscopia com lavado broncoalveolar. Ao 7º e 21º dias do tratamento, um dos membros da equipa de pesquisa lhe far-lhe-á algumas perguntas para avaliar a evolução da doença.

Para participar no estudo deve ter 15 anos de idade ou mais e dar manifestamente a sua autorização por meio da assinatura desta folha. Entretanto, só os participantes com idade igual ou superior a 18 anos poderão assinar pessoalmente. Se a sua idade for inferior a 18 anos, no seu lugar, uma pessoa mais velha que tem a responsabilide de cuidar de si irá assinar em seu nome, este formulário.

3. Custos por você participar nesta pesquisa:

Não há nenhum custo para você participar neste estudo. O custo dos procedimentos e dos exames de laboratório serão cobertos pelo estudo.

4. Riscos possíveis por você participar nesta pesquisa:

Depois do procedimento, poderá sentir algum desconforto respiratório ou episódios de tosse, no entanto se se sentir mal por estes ou por quaisquer outros sintomas, deverá chamar qualquer membro da equipa em serviço na enfermaria e explicar-lhe o que estará a acontecer. Imediatamente serão tomadas as medidas necessárias para reverter a situação.

5. Participação no estudo

A participação no estudo é voluntária. Se decidir não participar, ou interromper a sua participação a qualquer momento, o acesso aos cuidados de saúde não será afectado. Em caso de decidir

interromper a participação no estudo você simplesmente precisará de informar essa decisão a qualquer membro da equipa de pesquisa ou ao seu médico assistente a qualquer momento.

#### 6. Benefícios por você participar nesta pesquisa:

Não haverá nenhum benefício monetário por participar no estudo. Contudo, este estudo irá permitir que o médico confirme ou exclua o diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* contribuindo para que o Médico escolha o melhor plano de seguimento e o medicamento mais adequado para o tratamento da doença que lhe incomoda.

#### 7. A quem contactar se tiver perguntas ou dúvidas?

Se você tiver alguma pergunta sobre esta pesquisa ou então sentir que sofreu danos por participar desta, por favor fique à vontade para contactar a *Nelson António Munjovo Vilanculo*, pelo telefone 823840774, *Alfeu Passanduca* pelo número 825808860, ou contactar os seus Supervisores Académicos, *Dra. Elizabete Nunes*, pelo telefone número 823102470, e *Dr. Jahit Sacarlal* pelo telefone celular número 825881101.

Para obter informação adicional sobre o consentimento ou sobre os seus direitos como participante deste estudo, poderá contactar o Comité Nacional de Bioética para a Saúde pelos seguintes telefones: 430814/427131(4); Telefax: 6-239 MISAU MO; Fax: 258 (1) 426547, 258 (1) 33320 ou pelo endereço: Ministério da Saúde, C. Postal 264 cita na Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende, Maputo.

#### 8. Confidencialidade:

Todos os esforços serão feitos para proteger a sua informação clínica e os seus resultados da análise da expectoração. O seu nome só será usado para garantir que o seu resultado seja anexo ao seu processo clínico evitando troca acidental do mesmo. Quando os resultados deste estudo forem divulgados, toda a informação identificadora será removida e /ou alterada para que você não possa ser identificado.

#### 9. Declaração concordando em participar nesta pesquisa:

*Eu li esta declaração de consentimento para participação na pesquisa e/ou foi-me lido o consentimento e foram-me explicados os propósitos da pesquisa. Todas as minhas perguntas e dúvidas foram respondidas e eu livre e voluntariamente aceito em participar nesta pesquisa:*

*..... Sim, eu aceito participar neste estudo.*

.....

Nome do Participante

Assinatura do Participante

.....

O Médico

Data: ..... / ..... / .....

**APÊNDICE 5: Requisição para Identificação de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* no LBA**

Protocolo do estudo: **Detecção Molecular de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum* em pacientes infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique.**

*Versão 03 de 28 de Maio de 2015*

**I DADOS DEMOGRÁFICOS E DE ESTUDO**

- Data de recrutamento ao estudo (dd/mmm/aaaa) |\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|
- Data de hospitalização (dd/mmm/aaaa) |\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|
- Número de hospitalização (NID) |\_|\_|\_|\_|
- Número do participante no estudo |\_|\_|\_|\_|
- Idade |\_|\_|\_|\_|
- Sexo Masculino Feminino
- Enfermaria onde está internado |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
- Número de cama |\_|\_|\_|\_|

**II CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Doente preencheu os critérios de inclusão? Sim Não
- Doente já estava sob profilaxia para antifugicos habituais? Sim Não
- Qual antifugicos? |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
- Doente já estava sob TARV? Sim Não
- A quanto tempo (em meses) |\_|\_|\_|
- Tipo de amostra biologica LBA  
Expectoração induzida

**DATA DA PROXIMA VISITA**

|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

Ass.:

Data |\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

## **APÊNDICE 6: Protocolo de Extração de DNA**

Banhos (úmido =56°, seco =70°) Centrífuga refrigerada (condição de uso 3000 rpm, 4°, 5')

### **1 Pipetar:**

- ✓ 20 µl de QIAGEN Protease (ou Proteinase K)
- ✓ 200 µl de **amostra** ao tubo de micro centrífuga. (Se o volume da amostra for inferior a 200 µl, adicione o volume apropriado de PBS).
- ✓ 180ul do Baffer **ATL**, **Vortexar por 30"** e **Incubar a 56 ° C durante 20 min** (e fechar a tampa).

O rendimento de ADN atinge um máximo após a lise durante 10 min a 56 ° C. Incubação mais longa não têm efeito sobre o rendimento ou a qualidade do DNA purificado.

**2** Adicionar 200 µl de Tampão **AL** . **Vortexar por 30"** e **Incubar a 70°C (mult block) durante 10 min.**

**3** Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) à amostra, e misturar novamente por vórtex por 30 s. Após a mistura, centrifugar rapidamente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para remover as gotas do interior da tampa (SPIN)

**4** Aplicar cuidadosamente a mistura do passo 3 à coluna QIAamp de recolha, e centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min.

**5** Adicionar 500 µl de Buffer **AW1**. Fechar a tampa e centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min.

**6** Adicionar 500 µl de Buffer **AW2**. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade máxima (20 000 x g, 14 000 rpm) Durante 3 min,e descartar o tubo coletor.

**7** Adicionar 50µl de **AE** baffer ou água, Incubar a Temperatura ambiente durante 5 minutos antes de centrifugar (isto geralmente aumenta o rendimento de DNA). E centrifugar a 7000g( 10000rpm) por 5'.

**8** Estocar o DNA a -20°C

## APÊNDICE 7: Sistema de pontuação para PCP

Sistema de pontuação segundo Smith, Forbes & Gazzard (1992) e a importância em prever PCP em 50 pacientes incluídos no estudo.

Característica	Número de pacientes	Pontuação
<b>Pontuação Inicial</b>	50	+3
<b>Sintomas Clínicos</b>		
<b>Sim</b>	10	+6
<b>Não</b>	40	-9
<b>Sem profilaxia</b>		
<b>Sim</b>	23	+7
<b>Não</b>	27	-9
<b>Rx Tórax com infiltrados</b>		
<b>Sim</b>	47	+12
<b>Não</b>	03	-6
<b>Dessaturação</b>		
<b>Sim</b>	22	+9
<b>Não</b>	28	-13
<b>Possíveis pontuações</b>		-34 a +37

Probabilidade de PCP de acordo com *pontuação* final.

Pontuação Final	Pacientes n (%)	% PCP
<-3	13 (6,5%)	<23
-3 a +6	23 (11,5%)	40-65
>+6	3 (1,5%)	82-87
>+19	11 (5,5%)	>89

3 Pacientes apresentaram 4 fatores preditivos para PCP =98% ter PCP

8 Pacientes apresentaram 3 fatores preditivos para PCP incluindo dessaturação= 87% ter PCP

2 Pacientes apresentaram 3 fatores preditivos para PCP sem dessaturação =82 % ter PCP

Se estiverem presentes todos os factores (4) a probabilidade de PCP e de 98%, caso estejam 2 ou abaixo disso será < 23%, e se forem 3 sera 82%(Maggiolo F. ET AL. 1992).