



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Infeção por *Pneumocystis jirovecii* em doentes
seropositivos para VIH e suspeita de tuberculose pulmonar
na Guiné-Bissau.

José Maria Ferreira Crato Júnior

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA

(SETEMBRO, 2023)



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Infeção por *Pneumocystis jirovecii* em doentes
seropositivos para VIH e suspeita de tuberculose pulmonar
na Guiné-Bissau.

Autor: José Maria Ferreira Crato Júnior

Orientador: Professora Doutora Olga Matos (IHMT/UNL)

Coorientador: Professora Doutora Maria Luísa Lobo (IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimentos de requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu avô **José Luís Ferreira crato**, pela pessoa que me tornei hoje, embora ele não esteja presente para testemunhar o meu êxito, à minha mãe **Maria Odete Fernandes** e ao meu pai **José Maria Ferreira Crato** que me apoiaram incondicionalmente na materialização do meu sonho de me tornar um homem da ciência. É com muito orgulho que dedico este trabalho de forma especial à minha esposa, a enfermeira **Aminta Josenaide Có**. Por conta do meu egoísmo, para alcançar meu objetivo educacional, tive que deixá-la grávida, sofrendo sozinha, com a minha ausência, que perdurou durante toda a gravidez, parto e até ao nono mês de vida da nossa linda filha **Paloma Elizabete Ferreira Crato**, que é minha força e razão de lutar dia após dia. E além do meu ciclo familiar dedico esse trabalho a você Professora Doutora **Olga Matos** pelo que tem feito na minha vida acadêmica como pessoal. E fico lisonjeado por ser o último fruto da sua árvore acadêmica. E que tenha uma boa reforma.

Agradecimentos

Toda a sabedoria vem do Senhor Deus, ela sempre esteve com ele. Ela existe antes de todos os séculos. (Eclesiástico 1) Por isso que agradeço a Deus pelo dom da vida.

Se este trabalho foi iniciado e concluído com sucesso foi graças a duas pessoas que acreditaram em mim e sempre me motivaram a continuar, mas nunca deixaram de me criticar, dando as soluções ao mesmo tempo. Talvez não existam palavras que me permitam agradecer a vocês com justiça, com o devido merecimento.

Estou-me referindo à Professora Doutora **Olga Matos** e à Doutora **Maria Luísa Lobo**.

A Doutora Olga Matos sendo a orientadora deste trabalho, desempenhou um papel crucial nas correções e ensinamentos que me possibilitou adquirir mais o conhecimento no âmbito do trabalho académico e tudo isso foi feito num ambiente de muita amizade.

E agradeço a todos os professores do IHMT, em particular do mestrado em Parasitologia Médica, na pessoa da coordenadora do curso Professora Doutora Carla Sousa que me motivou a não desistir do curso por motivos de dificuldades que tive no passado, autorizando a minha presença todos os dias no IHMT, à Professora Doutora Isabel Maurício pela sua franqueza e imparcialidade tem sido um exemplo a seguir, ao Doutor Pedro Ferreira pela suas qualidades humanas e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Agradeço igualmente a todos os profissionais afetos às seguintes instituições, que direta ou indiretamente apoiaram este trabalho:

Hospital Raoul Follereau, Bissau, República da Guiné-Bissau – Dr. Abdel Midana Tigna;
Hospital Mal de Hansen – Dr. Cassimo Bisonha, Dra. Ausa Mango e Dra. Usta Mango;
Laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, UEI de Parasitologia Médica, IHMT-NOVA, Lisboa, Portugal.

Resumo

A imunossupressão é o maior fator de risco da pneumocistose, uma pneumonia intersticial severa causada por *Pneumocystis jirovecii* (PPC), seja em doentes com sida ou em doentes seronegativos para vírus da imunodeficiência humana (VIH) com outras imunodeficiências de grau moderado.

VIH, penetra e destrói os linfócitos TCD4⁺, tornando os doentes, no decorrer da sua infecção, mais suscetíveis a infecções por microrganismos oportunistas, tais como *Mycobacterium tuberculosis* (agente da tuberculose [TB]) e *P. jirovecii* (agente da PPC), que são dos agentes de pneumonia mais importantes e perigosos em doentes imunocomprometidos.

A pneumocistose é considerada uma doença definidora de sida e foi considerada uma doença emergente em África, enquanto na Europa e América tem sido uma infecção comum em imunocomprometidos.

África, na sua zona central e ocidental, registou 4,7 milhões de pessoas infetadas por VIH, sendo que um terço dessa população não recebia terapêutica antirretroviral (TARV), com risco iminente de contrair doenças oportunistas, nomeadamente TB e PPC. A Guiné-Bissau é um país da África Ocidental com prevalência elevada de casos de TB pulmonar e VIH, mas não há qualquer informação sobre a existência de casos de infecção por *P. jirovecii* nem de PPC. Assim, o objetivo desta dissertação de mestrado foi realizar o primeiro levantamento, neste país, sobre a existência de casos de infecção por *P. jirovecii* em doentes VIH-positivos com sintomatologia respiratória e suspeita de TB pulmonar, tendo participado neste estudo 61 doentes com estas características.

A identificação de *P. jirovecii* foi feita em expetoração espontânea através da técnica de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM) em paralelo com a deteção molecular de DNADNA de *P. jirovecii* por PCR-nested. Neste estudo, 26,2% (16/61) dos doentes estudados foram positivos para *P. jirovecii*, utilizando ambas as técnicas laboratoriais. Os doentes do género feminino registaram 62,5% (10/16) de positivos contra 37,5% (6/16) dos doentes do género masculino. Dos positivos, 68,8% (11/16) tinham diagnóstico de TB pulmonar e 31,3% (5/16) não tinham diagnóstico de TB. Metade (50,0%) dos doentes positivos para *P. jirovecii* encontravam-se no grupo etário dos 18-38 anos. Não se encontraram associações significativas entre a presença de *P. jirovecii* nas amostras biológicas dos doentes estudados e as variáveis género, grupo etário, grupo étnico, diagnóstico de tuberculose pulmonar e diagnóstico de outras infecções, profilaxia anti-*P. jirovecii* e administração de TARV.

Em conclusão, na República da Guiné-Bissau encontrámos doentes infetados por *P. jirovecii*, no entanto, devido às limitações do estudo, não conseguimos determinar se existem casos de PPC e a sua prevalência. Mais estudos são necessários envolvendo um maior número de doentes e desenhados para permitir a determinação da prevalência de casos de PPC e de portadores assintomáticos, que podem desempenhar um papel importante na propagação da infecção na comunidade.

Palavra chave: imunodeficiência; VIH; infecções respiratórias oportunistas; coinfeções; Guiné-Bissau.

Abstract

Immunosuppression is the biggest risk factor for pneumocystosis, a severe interstitial pneumonia caused by *Pneumocystis jirovecii* (PPC), either in patients with AIDS or in seronegative patients for the human immunodeficiency virus (HIV) with other moderate immunodeficiencies.

HIV penetrates and destroys CD4⁺ T lymphocytes, making patients, during the course of infection, more susceptible to infections by opportunistic microorganisms, such as *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis agent [TB]) and *P. jirovecii* (PPC agent), which are of the most important and dangerous pneumonia agents in immunocompromised patients.

Pneumocystosis is considered an AIDS-defining disease and is considered an emerging disease in Africa, while in Europe and America it has been a common infection in immunocompromised individuals.

Africa, in its central and western regions, registered 4.7 million people infected with HIV, with a third of this population not receiving antiretroviral therapy (ART), with an imminent risk of contracting opportunistic diseases, namely TB and PPC. Guinea-Bissau is a West African country with a high prevalence of pulmonary TB and HIV cases, but *P. jirovecii* infection or cases of PPC have never been documented. Thus, the objective of this master's thesis was to carry out the first survey, in this country, on the existence of cases of infection by *P. jirovecii* in HIV-positive patients with respiratory symptoms and suspected pulmonary TB, with the participation of 61 patients with these characteristics. The identification of *P. jirovecii* was made in spontaneous sputum using a direct immunofluorescence technique with monoclonal antibodies (IFI/AcM) in parallel with the molecular detection of *P. jirovecii* DNA by nested-PCR.

In this study, 26.2% (16/61) of the patients studied were positive for *P. jirovecii*, using both laboratory techniques. The female gender registered 62.5% (10/16) of positives against 37.5% (6/16) of the male gender. Of those positive, 68.8% (11/16) were diagnosed with TB and 31.3% (5/16) were negative for TB. Most positive patients were in the 18-38 age group with 50.0%. No significant associations were found between the presence of *P. jirovecii* in the biological samples of the patients studied and the variables gender, age group, ethnic group, diagnosis of pulmonary tuberculosis and diagnosis of other infections, anti-*P. jirovecii* prophylaxis and ART administration.

In conclusion, in the Republic of Guinea-Bissau we found patients infected by *P. jirovecii*, however, due to the limitations of the study we were unable to determine whether there are cases of PPC and its prevalence. More studies are needed, involving a greater number of patients, and designed to allow the determination of the prevalence of PPC cases and cases of asymptomatic carriers, which may play an important role in spreading the infection in the community.

Keywords: imunodeficiency; HIV; opportunistic respiratory infections; coinfections; Guinea-Bissau.

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento teórico	3
1.1.1 Origem e situação epidemiológica de VIH e PPC no Mundo	3
1.1.2 Origem e situação de TB no Mundo	4
1.2 Situação na República da Guiné-Bissau	5
1.2.1 Contexto Geográfico e Condições Climáticas da Guiné-Bissau	5
1.2.2 Divisão administrativa e sanitária	5
1.2.3 SNS da República da Guiné-Bissau: primeiros passos e constrangimentos (PNDS I, II e III).....	6
1.2.4 Compromissos assumidos pela República da Guiné-Bissau no cumprimento da agenda 2030 de combate a VIH.....	7
1.2.5 Situação na República da Guiné-Bissau relativamente à pneumonia por <i>Pneumocystis</i>	8
1.3 Revisão bibliográfica sobre <i>Pneumocystis jirovecii</i> e a PPC.....	9
1.3.1 Taxonomia	9
1.3.2 O ciclo de vida	10
1.3.3 Patogenia da PPC.....	12
1.3.4 Manifestações clínica da PPC.....	13
1.3.5 Diagnóstico laboratorial da PPC.....	13
1.3.6 Tratamento e profilaxia da PPC.....	14
1.3.7 Profilaxia.....	15
1.4 Objetivos	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Local do Estudo.....	18
2.2 Desenho do Estudo.....	18
2.3 População do Estudo	18
2.3.1 Critérios de Inclusão no estudo.....	18
2.3.2 Processamento da informação clínica e epidemiológica	19
2.4 Métodos.....	20
2.4.1 Colheita das amostras	20
2.4.2 Processamento das amostras de expetoração espontânea (Laboratório na Guiné-Bissau)	21
2.4.3 Identificação de <i>Pneumocystis jirovecii</i> em expetoração espontânea por técnica de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM).....	21

2.4.4	Deteção molecular de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	22
2.4.5	Visualização dos produtos de PCR.....	24
2.4.6	Critério de positividade.....	26
2.4.7	Análise dos dados	26
3.	RESULTADOS	27
3.1	Resultados demográficos e clínicos	27
3.2	Deteção de <i>Pneumocystis jirovecii</i> : imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IF-AcM) e PCR-nested tendo como alvo o gene que codifica a mt(LSU)rRNA de <i>P. jirovecii</i>	32
3.3	Fatores associados à detecção de <i>P. jirovecii</i> nas amostras de expetoração espontânea dos 61 doentes estudados.	36
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	40
4.1	Limitações do estudo.....	45
4.2	Conclusões	46
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
6.	ANEXOS	61
6.1	Anexo nº 01 – Consentimento informado	61
6.2	Anexo nº 02 - Questionário	62
6.3	Anexo nº 03 – Quadro comparativo entre a presença de <i>P. jirovecii</i> na população analisada no presente trabalho e em outros estudos desenvolvidos em África.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de divisão Administrativa da República da Guiné-Bissau (imagem adaptada de Guiné-Bissau, 2009).	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. jirovecii</i> no alvéolo pulmonar do ser humano, o qual possui duas fases: a fase de reprodução assexuada (A) e a fase de reprodução sexuada (B) hipotética (imagem adaptada de CDC, 2023).	11
Figura 3 : Imagem representativa das principais estruturas da forma trófica de <i>P. jirovecii</i> (adaptado de De Souza & Benchimol, 2005).	12
Figura 4. Imagem ilustrativa das formas quísticas de <i>P. jirovecii</i> e das suas principais extruturas (adaptado de De Souza & Benchimol, 2005).	12
Figura 5. Quistos de <i>P. jirovecii</i> , visualizados pela técnica de IFI-AcM, em expectoração expontânea (×1000) (original do autor).	32
Figura 6. Separação electroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos do nested-PCR de um fragmento de 263 pb do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial.	33

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Fármacos para tratamento da PPC (baseado em Matos et al., 2021).....	15
Quadro 2. Fármacos para a profilaxia da PPC (baseado em Matos et al., 2021).....	16
Quadro 3. Sequências nucleotídicas e características (dimensão do oligonucleótido, temperatura de hibridação/TA, conteúdo em CG e tamanho do fragmento de amplificação) dos primers utilizados para amplificação do gene mtLSUrRN de <i>P. jirovecii</i>	23
Quadro 4. Condições da reação de amplificação do gene mtLSUrRNA de <i>P. jirovecii</i>	24
Quadro 5. Dados demográficos dos 61 doentes confirmados ou com suspeito de Tuberculose pulmonar	27
Quadro 6. Dados clínicos dos 61 doentes com suspeita ou confirmação de tuberculose pulmonar, incluídos neste estudo.....	28
Quadro 7. Nível de PaO ₂ no sangue dos 52 doentes que apresentaram o resultado deste teste no relatório clínico.....	29
Quadro 8. Padrão de raio-x dos 35 doentes com informação radiológica, incluídos neste estudo.....	30
Quadro 9. Dados clínicos (período de diagnóstico de VIH, administração de TARV, profilaxia e terapêutica de pneumocistose, e diagnóstico de saída) dos 61 doentes com confirmação ou com suspeita de tuberculose pulmonar, incluídos neste estudo.....	31
Quadro 10. Presença de <i>P. jirovecii</i> em amostras de expetoração espontânea, observada por técnica de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IF-AcM) e PCR-nested (gene mtLSUrRNA de <i>P. jirovecii</i>), de doentes com confirmação ou com suspeita de tuberculose pulmonar, incluídos neste estudo.....	34
Quadro 11. Informação demográfica, clínica, laboratorial e parâmetros da doença correspondentes aos 16 doentes positivos para <i>P. Jirovecii</i> , identificados no estudo. ...	35
Quadro 12. Distribuição da frequência de <i>P. jirovecii</i> nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao género dos 61 doentes englobados no estudo.....	36
Quadro 13. Distribuição da frequência de <i>P. jirovecii</i> nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao grupo etário dos 61 doentes englobados no estudo.	37

Quadro 14. Distribuição da frequência de <i>P. jirovecii</i> nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao grupo étnico dos 61 doentes englobados no estudo.	37
Quadro 15. Distribuição da frequência de <i>P. jirovecii</i> nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao diagnóstico de tuberculose pulmonar dos 61 doentes englobados no estudo.	38
Quadro 16. Distribuição da frequência de <i>P. jirovecii</i> nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao diagnóstico de outras coinfeções dos 61 doentes englobados no estudo.	38
Quadro 17. Distribuição da frequência de <i>P. jirovecii</i> nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação à administração de profilaxia anti- <i>P. jirovecii</i> dos 61 doentes englobados no estudo.	39
Quadro 18. Distribuição da frequência de <i>P. jirovecii</i> na expetoração espontânea em relação à administração de terapêutica anti retrovírica (TARV) dos 61 doentes englobados no estudo.	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
AS	Áreas de Saúde
<i>g</i>	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
Cél/mm ³	Células por milímetro cúbico
CPS	Cuidados primários de saúde
DDT	Ditiotreitol
DSS	Determinantes sociais de saúde
ECDC	Centro Europeu de prevenção e controle de Doenças do inglês <i>European Centre for disease Prevention and Control</i>
EI-	Expetoração induzida.
<i>et al.</i>	“E outros”, da locução latina <i>et al</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAAPA	Federação Atlântica de Agências de Notícias Africanas do francês <i>federation Atlantique des agences de presse africaines</i>
°C	Grau Celsius
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
INASA	Instituto Nacional de Saúde Pública
MINSAP	Ministério de Saúde Pública
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
pb	Par de bases
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PES-	Plano Estratégico de sector de Saúde
%	Porcentagem
PPC	Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês <i>Real time-PCR polymerase chain reaction</i>

rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico, do inglês <i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i>
RGB	República da Guiné-Bissau
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RS	Regiões de sanitária
Rpm	Rotação por minuto
SAB	Setor autónomo de Bissau
Sida	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNS	Serviço Nacional de Saúde
TARV	Terapia antirretroviral
TB	Tuberculose
TBO	coloração com azul de toluidina
TCD4+	Linfócito T da linhagem CD4, do inglês <i>cluster of differentiation 4</i>
TMP-SMX	Trimetoprim-sulfametoxazol
U	Unidade
UNL	Universidade Nova de Lisboa
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
X ²	Teste de chi-quadrado

1. INTRODUÇÃO

A pneumocistose ou pneumonia por *P. jirovecii* (PPC) é uma doença que nos tempos anteriores ao surgimento da pandemia de vírus da imunodeficiência humana (VIH)/síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) era considerada pouco frequente ou rara. Com o aparecimento desta pandemia, mudou-se de paradigma passando a PPC a ser uma grande preocupação para as autoridades de saúde, devido à sua alta taxa de mortalidade, que nos anos noventa do século XX variava entre 20% a 40% (Esteves *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2017).

Pneumocystis é um organismo patogénico com tropismo para o pulmão, sendo a espécie encontrada nos pulmões humanos designada por *jirovecii*. *P. jirovecii* é capaz de provocar pneumonia intersticial severa em doentes imunocomprometidos, seja por VIH/Sida ou por outras imunodeficiências de grau moderado causadas por terapias imunossupressoras para o tratamento de doenças oncológicas, por transplante de órgãos ou por doenças autoimunes. Esta patologia também pode ocorrer em pessoas imunocompetentes, mas com comprometimento pulmonar (Matos, 2021).

O evoluir da infeção por VIH causa imunodeficiência devido à capacidade que este vírus tem de infetar e destruir os linfócitos TCD4+, tornando os seropositivos para VIH, no decorrer da sua infeção, mais suscetíveis a infeções por microrganismos oportunistas, tais como *Mycobacterium tuberculosis* (agente da tuberculose [TB]) e *P. jirovecii* (agente da PPC), que são dos agentes de pneumonia mais importantes e perigosos em doentes imunocomprometidos (Sheikholeslami *et al.*, 2015).

A PPC e a TB são ambas doenças intersticiais frequentes nos imunocomprometidos, que provocam lesões nos pulmões, levando a dificuldade nas trocas gasosas, sendo no caso da PPC a pressão parcial de oxigénio no sangue periférico ≤ 70 mmHg (Matos, 2021).

Até final da década 1980, a PPC foi um fardo para as autoridades europeias e dos Estados Unidos da América (EUA) pelo facto de acompanhar a pandemia de VIH/Sida, causando nesta morbilidade de 70-80% e mortalidade de 20–40% (Esteves *et al.*, 2014). No final da década de 1980, com a introdução do tratamento profilático contra a PPC, e em meados da década de 1990 com a introdução da terapêutica anti retrovímica (TARV) verificou-se uma redução drástica na incidência de casos de PPC e das outras doenças

oportunistas (Esteves *et al.*, 2014). Atualmente, a PPC é considerada uma das principais doenças definidoras de sida no velho mundo e em alguns países de novo mundo, assim como na África subsaariana, onde esta doença é, também, considerada emergente.

A TB é, também, considera uma importante doença definidora de sida, no entanto, ao contrário das outras doenças oportunistas, a TB manifesta-se muito cedo no decurso da infeção por VIH (Aaron *et al.*, 2004).

No que diz respeito à infeção por VIH em África, em 2021 a UNAIDS reportava uma taxa alta de casos de seropositivos para VIH, numa média de 20,6 milhões na África do Sul e oriental e 4,7 milhões na África central e ocidental (UNAIDS, 2021). Daqueles que vivem com VIH a média dos que aderiram ao tratamento anti retrovírico foi de 77% na África do Sul e oriental e de 73% na África central e ocidental. Assim, quase 25% da população africana infetada por VIH não recebe tratamento anti retrovírico, havendo um risco iminente de contrair as doenças oportunistas definidoras de sida, nomeadamente TB e PPC (UNAIDS, 2021).

Assim, no continente africano, na região subsaariana, o acesso à terapia anti retrovírica, embora não ideal, e a melhoria das condições laboratoriais para o diagnóstico da PPC têm levado lentamente a uma diminuição do número de casos notificados desta doença (Wasserman *et al.*, 2016).

A Guiné-Bissau é um país da África ocidental com prevalência elevada de casos de TB e VIH, ambos com programas de controlo (Programa Nacional de Luta contra VIH/Sida e Luta Contra Tuberculose), à semelhança de outros países. Na Guiné-Bissau os primeiros casos de infeção por VIH foram reportados em 1985-1986, tendo sido descrita, recentemente, uma alta prevalência e excesso de mortalidade de doentes com diagnóstico tardio de infeção por VIH-1, VIH-2 e VIH-1/2 (Hønge *et al.*, 2016).

Em 2017 a infeção por VIH/Sida tinha uma prevalência de 3,3% e, esse facto, permitiu que a TB ganhasse maior dimensão e contorno diferente assumindo protagonismo de doença oportunista mais frequente nos doentes VIH (Manjuba, 2007; Lima HMM, 2017).

No primeiro semestre de 2017 foram reportados 1157 casos de TB, dos quais 36,50% eram co infetados com VIH/Sida e destes 890 eram casos novos, com confirmação bacteriológica, segundo o relatório do Instituto Nacional de Saúde Pública (INASA, 2017). Em 2019, numa entrevista a Federação Atlântica de Agências de Notícias

Africanas (FAAPA) o coordenador do programa nacional de luta contra a tuberculose na pessoa de Miguel Camara afirmou que foram reportados 2422 casos de TB, dos quais 83% eram co infetados com VIH/Sida e desse total de casos 71% completaram o tratamento com sucesso, 13% abandonaram o tratamento, 11% faleceram e verificou-se 33 casos de resistência ao tratamento (FAAPA, 2019). Quanto a casos de PPC nada se sabe sobre a sua existência na Guiné-Bissau e muito menos são conhecidos dados epidemiológicos, mas faz-se prevenção da mesma e de outras infeções oportunistas em seropositivos para VIH/Sida com trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) cotrimoxazol, segundo o relatório de Luta contra a Tuberculose (PNLT, 2017).

A TB na Guiné-Bissau é um problema de Saúde Pública muito sério nos grupos mais vulneráveis, adultos jovens entre os 15 e 44 anos de idade e doentes vivendo com VIH/Sida (INASA, 2017).

Como tal, o rastreio dos portadores de *P. jirovecii* na população de doentes com patologia pulmonar, nomeadamente TB, e a notificação dos resultados aos clínicos, é importante para o seguimento destes doentes e para a instituição da profilaxia e do tratamento anti-PPC, que atualmente, na Guiné-Bissau, é empírico.

Esta informação pode ser, também, uma mais-valia para a direção clínica dos hospitais poderem determinar se se justifica a implementação de técnicas de diagnóstico laboratorial da PPC com o intuito de melhor controlar e prevenir esta doença oportunista.

1.1 Enquadramento teórico

1.1.1 Origem e situação epidemiológica de VIH e PPC no Mundo

P. jirovecii é o microrganismo responsável pela PPC ou pneumocistose. O Dr. Carlos Chagas em 1909, no Rio de Janeiro, Brasil foi o médico e investigador que descobriu este organismo patogénico, ao observar ao microscópio formas quísticas multinucleadas em cortes histológicos de pulmões de roedores doentes com patologia de etiologia desconhecida, que ele posteriormente verificou ser devido à infeção por *Trypanosoma cruzi*. Em 1914, no Instituto Pasteur de Paris, O casal de investigadores Delanoe acabou por considerar estas formas quísticas como uma nova espécie de

protozoário a qual designou por *Pneumocystis carinii*, tendo em conta o tropismo da espécie para o pulmão e em homenagem ao biólogo italiano que trabalhava em São Paulo, Brasil e que lhes enviou as amostras biológicas para análise (De Souza, 2005; Calderón-Sandubete, 2002). Só em meados do século XX (durante e após a II Grande Guerra) é que vieram a ser reportados casos de pneumonia por *Pneumocystis* nos humanos, em crianças prematuras e malnutridas, muitas delas vivendo em orfanatos. Um elo comum aos doentes que desenvolviam PPC eram sistemas imunitários débeis, devido a subnutrição, no caso de crianças, ou a anomalias congénitas, como a hipogamaglobulinémia, ou devido à ação de fármacos imunossupressores que provocavam baixa imunidade do indivíduo, por afetar o funcionamento das células T, B e os macrófagos, os principais componentes celulares do sistema imunitário envolvidos na imunidade celular e humoral.

No entanto, antes do aparecimento da pandemia de VIH/Sida nos anos oitenta do século XX, que infetou 78 milhões de pessoas, das quais 35 milhões morreram até 2016, a PPC era considerada uma doença rara. Com o surgimento desta pandemia verificou-se um enorme aumento do número de casos de PPC com grande mortalidade e morbilidade, passando esta patologia emergente a ser uma grande preocupação para as autoridades sanitárias, nos países industrializados. Assim, a PPC passou a ser conhecida na Europa e EUA como doença definidora de sida. Segundo a United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), foi estimado 1.500.000 novas infeções por VIH em 2020 (UNAIDS, 2021).

1.1.2 Origem e situação de TB no Mundo

O Bacilo de Koch foi identificado pela primeira vez por Heinrich Hermann Robert Koch, em 1882 como agente etiológico de tuberculose ou TB (Gradmann *et al*, 2006). Contudo, a doença surgiu muitos séculos antes de Cristo, no antigo Egipto (lesões pulmonares e deformações ósseas) e também no Peru (DNA de achados de múmias de há 5000 anos), dados obtidos em estudos arqueológicos comprovados por técnicas de biologia molecular. A TB também foi descrita na Bíblia, como sinónimo da palavra Hebraica *schachepheth* nos livros de Deuterónimo e Levítico (Daniel, 1999).

Nos séculos XVI e XVII ocorreram várias epidemias de TB na Europa que causaram grande morbilidade e mortalidade nas populações até à primeira metade do

século XIX. Na segunda metade deste século assistiu-se a uma redução da incidência de casos e da mortalidade por TB devido à melhoria das condições de saneamento básico e habitação nas grandes cidades europeias (Daniel, 2006; Jordão, 2014).

1.2 Situação na República da Guiné-Bissau

1.2.1 Contexto Geográfico e Condições Climáticas da Guiné-Bissau

A República da Guiné-Bissau é um país situado na zona costeira da África Ocidental, tendo fronteira ao Norte com a República do Senegal, a Leste e Sul com a República da Guiné, e a Oeste o Oceano Atlântico. Conta com uma superfície de 36.125 Km² e está localizada entre os meridianos 13° 38' e 16° 45' a oeste e os paralelos 10° 55' e 12° 40' a norte, com o meridiano central 15° a Oeste do meridiano de Greenwich. O clima é tropical, quente e húmido, com duas estações: a estação das chuvas, de maio a outubro, sendo agosto o mês de maior pluviosidade, e a estação seca, de outubro a maio, sendo abril e maio os meses mais quentes. As temperaturas médias anuais variam entre 30°C e 35°C e a vegetação é do tipo savana e floresta (Guiné-Bissau: III RGPH, 2009).

1.2.2 Divisão administrativa e sanitária

A divisão administrativa da República da Guiné-Bissau é de três províncias, que na sua maioria contêm três regiões exceto a Província Leste que tem duas regiões (Bafáta e Gabú), a Província Norte tem Oio, Cachéu, Biombo e a última Província Sul tem Quinara, Tombali e Bolama Bijagos, e mais o setor Autónomo de Bissau, atual Capital económica, política e administrativa (Figura 1). Essas regiões são divididas em 38 sectores, os quais por sua vez estão subdivididos em 108 secções, com aproximadamente 4.500 aldeias chamadas de ``Tabancas`` (INE, 1991).

A divisão sanitária é mais ampla, de modo que as regiões de Bolama e Oio estão subdivididas em duas, cada uma destas, devido à situação geográfica (Zona Insular) e às condições logísticas na resposta às urgências, totalizando 11 regiões sanitárias incluindo o sector Autónomo. As 11 regiões sanitárias (com apenas 5 hospitais regionais) contêm 114 áreas sanitárias (cada área contém entre 5000 e 12.000 habitantes) que são insuficientes para atender às necessidades de 66% da população, tendo em conta que os

locais de prestação de cuidados primários mais próximos estão a uma distância superior a 5km (Fronteira *et al*, 2007).



Figura 1. Mapa de divisão Administrativa da República da Guiné-Bissau (imagem adaptada de Guiné-Bissau, 2009).

1.2.3 SNS da República da Guiné-Bissau: primeiros passos e constrangimentos (PNDS I, II e III)

Tudo começou com um estudo piloto, que envolvia os profissionais de saúde provenientes da luta de libertação, após a independência em 1976, nas regiões de Cachéu e Tombali. Este estudo era financiado pela cooperação holandesa e apoiado pela OMS com o objetivo de levar a saúde à comunidade. Devido ao golpe de estado de 1980, com as mudanças políticas verificadas não foi possível saber se esse estudo piloto chegou a ser avaliado e, conseqüentemente, se chegou a contribuir para a elaboração da estratégia nacional de saúde.

Dois anos depois, em 1978, tendo como orientação a declaração de Alma-Ata sobre Cuidados Primários de Saúde, elaborou-se um projeto de saúde base, o qual deu origem ao Plano Nacional de Saúde (PNS), que veio a ser aprovado em 1993 tendo como prioridade a saúde materna, planeamento familiar, melhoria do sistema de saneamento, prevenção e controlo de doenças. Para que o PNS fosse implementado era necessário um

plano estratégico para o sector da saúde (PES) baseado na descentralização de serviços, melhoria no acesso e distribuição de recursos, melhoria de qualidade e desenvolvimento de um programa de formação e reciclagem dos quadros, reforço da cooperação intersectorial e criação de um sistema de informação sanitária. Isso deu origem ao primeiro Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário (PNDS-I), que foi apresentado e aprovado na mesa-redonda sectorial em 1997.

Para a implementação do PNDS-I foi estabelecido um horizonte temporal de 1998 a 2002, mas este plano acabou por ser prolongado para o período 2003 a 2007, devido ao conflito militar (golpe de estado) de 7 junho de 1998, que teve a duração de 11 meses, levando à fuga de grande número de quadros (médicos e enfermeiros) e à destruição de infraestruturas de saúde. Devido a esta situação tornou-se difícil a avaliação do PNDS-I no contexto pós-guerra. As autoridades sanitárias, no quadro do cumprimento dos objetivos do primeiro Documento de Estratégia Nacional de Redução da Pobreza DENARP-I, 2004, decidiram elaborar o segundo PNDS-II (2008-2017), mas também este não foi avaliado devido ao golpe de estado de 2012, levando ao afastamento dos parceiros e financiadores (DENARP, 2004; PNDSII, 2008). Em 2017 com a revisão de PNS de 1993 e com o plano estratégico do governo ``Terra ranka (2015-2025) ´´, que substituiu o DENARP, elaborou-se o PNDS-III com os subsídios provenientes da primeira conferência nacional de saúde realizada em 2014. No entanto, devido à atual instabilidade política, a implementação deste novo plano também parece estar comprometida (Guerreiro *et al.*, 2019), O que veio a se confirmar por não se conseguir fazer a sua avaliação intercalar em 2020 como prevista (DJATA, 2020),

1.2.4 Compromissos assumidos pela República da Guiné-Bissau no cumprimento da agenda 2030 de combate a VIH

A República da Guiné-Bissau que é um dos 196 países membros da Organização das Nações Unidas (ONU), tem frequentemente assinado e retificado vários acordos e convenções em diferentes domínios, alguns dos quais de combate a VIH/Sida e outras doenças. Segundo a meta estabelecida pela ONU nos oito Objetivos de Desenvolvimento do Milénio (ODM) em 2000, havia duas metas relacionadas com VIH, que eram reduzir a incidência e a transmissão desta infeção até 2015 e cobertura universal do tratamento anti retrovírico até 2010 (IPEA, 2014), metas essas que não foram atingidas pela

República da Guiné-Bissau devido às mudanças frequentes de clínicas de VIH e fornecimento inadequado de medicamentos, levando a interrupções do tratamento (Jespersen *et al.*, 2020).

Em janeiro de 2017 a UNAIDS lançou uma meta ambiciosa (até 2020) para acabar com a epidemia de VIH denominada 90-90-90 que significa até 2020, 90% de todos Doentes infetados por VIH deviam ser diagnosticados. Destes, 90% deviam estar em TARV e 90% destes deviam estar com carga viral suprimida (UNAIDS, 2017). Todavia, a República da Guiné-Bissau não conseguiu atingir esse objetivo, os resultados mostraram que apenas cerca de 14% dos doentes infetados estão cientes da sua doença. Destes, apenas 20% estão em tratamento, e entre os doentes em tratamento no estudo PIONA, apenas 33% viram suprimida a carga viral após um ano de TARV (Jespersen *et al.*, 2018).

Para que a Guiné-Bissau consiga erradicar a infeção por VIH é necessário que invista na educação para a saúde voltada para a forma de transmissão da doença, uma vez que, segundo o sexto Inquérito aos Indicadores Múltiplos (MICS 6 do inglês *Multiple Indicator Cluster Surveys round 6*), só apenas 13% das mulheres entre os 15 e os 49 anos de idade conhecem duas formas de transmissão de VIH/Sida e quanto aos homens na mesma faixa etária apenas 31% (INE, 2020). Esse facto pode estar na origem do aumento de incidência da doença, posteriormente confirmado pela Secretaria Nacional de Luta contra a Sida na Guiné-Bissau numa entrevista dada à Deutsche Welle em Português para África (DW Africa) (Dw Africa, 2021).

1.2.5 Situação na República da Guiné-Bissau relativamente à pneumonia por *Pneumocystis*.

A PPC continua a ser uma infeção oportunista definidora de sida frequente nos países desenvolvidos, sendo comum e letal em doentes imunocomprometidos, VIH-positivos e VIH-negativos (Matos, 2021). Nas primeiras décadas da pandemia da sida a PPC raramente era reportada nos países africanos subsarianos, onde a maioria dos doentes com VIH/sida se encontravam (Matos, 2012). Os primeiros relatórios subestimaram as taxas de prevalência reais da PPC. Isso pode ter ocorrido em parte porque os doentes com sida não sobreviviam tempo suficiente para atingir um grau de imunodeficiência que levasse ao desenvolvimento de infeções oportunistas, como a PPC, e também devido à

falta de recursos e experiência no diagnóstico desta pneumonia (Matos, 2012). Em anos recentes, nos países em desenvolvimento da África subsariana a percentagem de casos desta pneumonia tem vindo a aumentar com o aumento do produto interno bruto (Kühle *et al.*, 2022) e naturalmente com a melhoria das condições de vida das populações e maior acessibilidade dos doentes com VIH/sida à TARV e à profilaxia anti-PPC (Bongomin *et al.*, 2017). Assim, atualmente a PPC é considerada uma causa importante de pneumonia adquirida na comunidade em adultos infetados por VIH na África subsariana (Wasserman *et al.*, 2016).

No que concerne à República da Guiné-Bissau, as autoridades sanitárias não têm dados sobre a existência de casos de PPC entre os doentes imunocomprometidos com sintomatologia respiratória, que são atendidos nos hospitais e outras instituições de saúde do país. No entanto, em um estudo muito recente sobre o número de mortes relacionadas com a TB, em adultos neste país, os autores observaram uma baixa taxa de deteção (confirmação laboratorial) de casos de TB (Kühle *et al.*, 2022). Também, verificaram que a TB mostrou ser uma causa frequente de morte, mas que, em muitos outros casos de morte em que havia suspeita de TB, esta não foi confirmada, enquanto noutro estudo onde a mortalidade foi associada com contagem de células TCD4+, mais de metade dos doentes envolvidos apresentava contagem de células TCD4+ <200 células/mm³ (Jespersen *et al.*, 2020), podendo-se pôr a hipótese de alguns destes casos nos dois estudos corresponderem a casos de PPC não diagnosticados.

1.3 Revisão bibliográfica sobre *Pneumocystis jirovecii* e a PPC

1.3.1 Taxonomia

Durante muitos anos *Pneumocystis* foi classificado como protozoário, com base em características morfológicas, na presença abundante de colesterol na parede celular, na sensibilidade a antiprotozoários, como a pentamidina e o TMP-SMX, na patologia associada e nos mecanismos de variação antigénica (Stringer *et al.*, 2002; Thomas e Limper, 2004). Entretanto, com o advento das técnicas de biologia molecular, os investigadores na área, usando técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), passaram a classificar este microrganismo oportunista no Reino Fungi (Ypma-Wong *et al.*, 1992).

Atualmente, a classificação taxonómica de *Pneumocystis* (Redhead *et al.*, 2006) é a seguinte:

Reino - Fungi
Sub-reino - Dikarya
Filo - Ascomycota
Sub-Filo - Taphrinomycotina sensu
Classe - Pneumocystidomycetes
Ordem - Pneumocystidales
Família - Pneumocystidaceae
Género - *Pneumocystis*
Espécie - *Pneumocystis jirovecii* (humano)

Técnicas moleculares revelaram a presença de microrganismos do género *Pneumocystis* em várias espécies de animais, mas a espécie *P. jirovecii* só é patogénica para o hospedeiro humano (Redhead *et al.*, 2006).

1.3.2 O ciclo de vida

O ciclo de vida de *P. jirovecii*, o qual se desenrola no espaço extracelular nos alvéolos pulmonares, tem sido difícil de demonstrar, uma vez que este microrganismo não é cultivável *in vitro* (De Souza & Benchimol, 2005) (Figura 2).

Entretanto, conhecem-se duas formas principais de desenvolvimento durante o ciclo de vida do microrganismo: a forma trófica, haploide, com reprodução assexuada, e a forma quística (ou asco) diploide, com reprodução sexuada e existem ainda formas intermédias como o esporócito (De Souza & Benchimol, 2005; Martinez *et al.*, 2011).

As formas tróficas podem sofrer conjugação formando uma célula diploide dando lugar à fase de reprodução sexuada, que ainda não está demonstrada. A célula diploide sofre uma meiose, seguida de mitose com a formação da forma quística ou asco, com oito células filhas no seu interior, os ascósporos. Com a maturação da forma quística, os oito ascósporos são libertados no espaço alveolar e transformam-se em novas formas tróficas (de Souza & Benchimol, 2005). Numa infeção por *Pneumocystis* as formas tróficas são as formas de desenvolvimento mais abundantes nos alvéolos pulmonares.

As formas tróficas (Figura 3), que têm um aspecto irregular, encontram-se nos alvéolos pulmonares em estreita associação com os pneumócitos do tipo I (de Souza &

Benchimol, 2005). Aquelas formas possuem uma membrana celular fina, com 20-50 nanómetros (nm) de espessura e na sua superfície externa têm expansões tubulares ou filopódias, que podem ser importantes na fixação, nutrição e locomoção deste organismo patogénico (de Souza & Benchimol, 2005).

As formas quísticas (Figura 4) são esféricas com poucas expansões tubulares à superfície e com um diâmetro médio de 5-8 micrómetros (μm), contendo até oito ascoporos, com cerca de 1-2 μm cada. A parede da forma quística tem duas camadas (camada externa fina e densa e camada interna espessa em contacto direto com a membrana celular) e possui cerca de 120-160 nm de espessura (de Souza & Benchimol, 2005; Matos *et al.*, 2017).

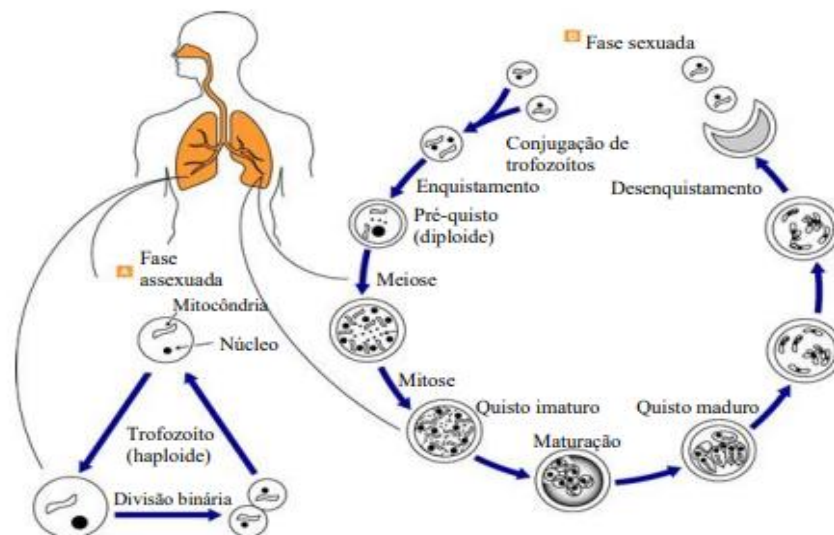


Figura 2. Ciclo de vida de *P. jirovecii* no alvéolo pulmonar do ser humano, o qual possui duas fases: a fase de reprodução assexuada (A) e a fase de reprodução sexuada (B) hipotética (imagem adaptada de CDC, 2023).

As formas quísticas encontram-se livres nos alvéolos pulmonares e são adquiridas por inalação, mas estão descritas outras localizações extrapulmonares de *P. jirovecii* (Matos *et al.*, 2017).

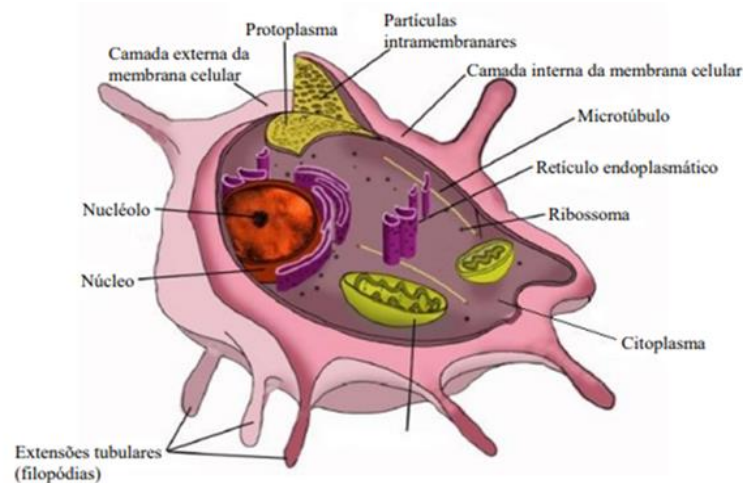


Figura 3 : Imagem representativa das principais estruturas da forma trófica de *P. jirovecii* (adaptado de De Souza & Benchimol, 2005).

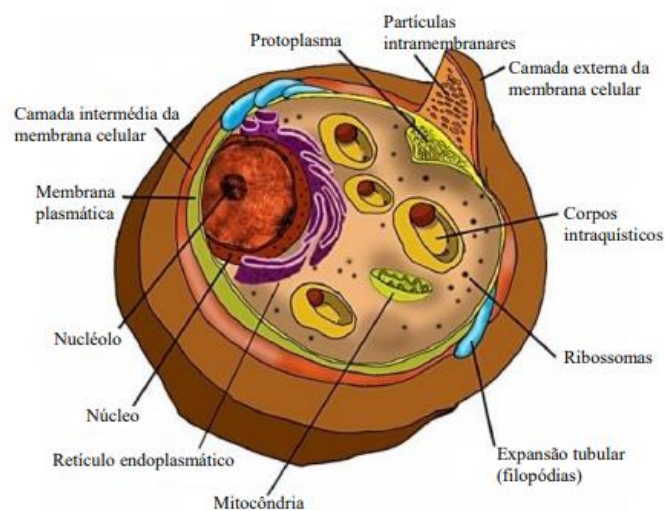


Figura 4. Imagem ilustrativa das formas quísticas de *P. jirovecii* e das suas principais estruturas (adaptado de De Souza & Benchimol, 2005).

1.3.3 Patogenia da PPC

A patogenia da PPC provém da ligação das formas tróficas aos pneumócitos do tipo I dos alvéolos pulmonares, por interdigitação das membranas celulares de ambas as células (Matos *et al.*, 2017). Esta interação, conduz ao aumento da proliferação do organismo patogénico, neste caso, de *Pneumocystis* e, ao mesmo tempo, à inibição do crescimento das células epiteliais alveolares do hospedeiro (Matos *et al.*, 2017).

No início da infecção, as reações inflamatórias resultam em alterações celulares com lesões limitadas. A evolução da infecção leva à formação e acumulação de exsudato inflamatório, que preenche os alvéolos pulmonares e ao aparecimento de lesões focais de necrose nos pneumócitos tipo I, hipertrofia das células alveolares e preenchimento dos espaços alveolares por células lesadas e formas tróficas e quísticas de *P. jirovecii* (Matos *et al.*, 2017).

1.3.4 Manifestações clínica da PPC

Embora *P. jirovecii* tenha uma afinidade para os pulmões, também já foram descritos casos de infecções em outros órgãos (Ruggli *et al.*, 1997). Quando se observam pulmões com uma infecção por *P. jirovecii* já instalada encontram-se sinais de inflamação e acumulação de exsudato inflamatório nos alvéolos que levam à perda parcial da absorção de oxigênio e consequentemente à hipoxemia, que se expressa clinicamente como dispneia seguida de tosse não produtiva (na maioria dos casos) (Yoneda & Walzer, 1983), e ainda esses sintomas são acompanhados de febre de 38°C a 40°C. Além disso, pode-se observar perda de peso e fraqueza muscular, que são mais visíveis nos seropositivos para VIH (Calderón *et al.*, 2010).

1.3.5 Diagnóstico laboratorial da PPC

O diagnóstico laboratorial da PPC pode ser feito por dois métodos: microscopia ótica ou de fluorescência e por métodos moleculares, usando espécimes respiratórios que são obtidos por técnicas diferentes, desde os não a pouco invasivos (expetoração espontânea, lavado oral e expetoração induzida) aos invasivos (lavado broncoalveolar e biópsia dos tecidos infetados).

Através da microscopia ótica pode-se observar a parede da forma quística de *P. jirovecii* corada de cinzento pela Metamina prata, e de lilás pelo azul de toluidina ou com fluorescência inespecífica pelo calcoflúor. Enquanto as formas tróficas e os oito ascósporos são corados pelos métodos de Giemsa e de Giemsa modificado (Diff-Quick), aparecendo o citoplasma destas células azul e o núcleo vermelho (Calderón *et al.*, 2010). Por sua vez, as imunofluorescências diretas ou indiretas com anticorpos monoclonais permitem a detecção de formas de *P. jirovecii* (Calderón *et al.*, 2010), marcadas por

moléculas fluorescentes (Fluoresceína) ligadas a antígenos de superfície de *P. jirovecii* havendo a emissão de uma coloração fluorescente verde-alface (Baughman *et al*, 1989; Lautenschlager *et al*, 1996; Bava, Cattaneo & Bellegarde, 2002).

No que concerne aos métodos moleculares, as técnicas de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) descritas (Arcenas *et al*, 2006; Huggett *et al.*, 2008) e PCR-*nested* (Wakefield *et al.*, 1990), amplificam segmentos de DNA específicos de *P. jirovecii*. Ambas as técnicas possuem uma grande importância, na análise quantitativa e qualitativa, respetivamente, em relação à presença deste microrganismo. As suas desvantagens, no caso da RT-qPCR, tem a ver com a dificuldade de distinguir casos de colonizados por *P. jirovecii* e doentes com PPC e no caso da PCR-*nested* é a fácil contaminação durante as várias fases do processamento (Huggett *et al.*, 2008).

A possível discordância entre os resultados dos dois métodos de diagnóstico (PCR positiva e microscopia negativa), leva à difícil interpretação do resultado. Essa discordância de resultados pode ser influenciada por três fatores: tipo de amostra colhida (expetoração espontânea, lavado oral e espetoração induzida, lavado broncoalveolar e biópsia de tecido); coloração (metamina prata, azul de toluidina, calcoflúor, Giemsa e Giemsa modificado (Diff-Quick) e a experiência do técnico de laboratório na observação ao microscópio (Calderón *et al.*, 2010).

Devido a este facto surgiram novas abordagens de diagnóstico, como a deteção de anticorpos anti-*Pneumocystis* no soro (Smulian *et al.*, 1993), e imunodeteção utilizando duas técnicas (imunoenzimática e immunoblotting) com antígenos recombinantes de *Pneumocystis*. Estes novos métodos têm-se revelado como possíveis métodos de diagnósticos alternativos aos métodos de coloração histoquímica nos estudos epidemiológicos (Daly *et al.*, 2002; Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009).

1.3.6 Tratamento e profilaxia da PPC

O tratamento da PPC dura três semanas (21 dias), independentemente do medicamento e da dose ou da via de administração. Os fármacos usados no tratamento e na profilaxia têm como alvo o metabolismo do parasita, inibindo algumas enzimas essenciais, comprometendo assim o metabolismo do parasita. Os medicamentos considerados de referências são TMP-SMX (Cotrimoxazol ou Bactrim) e Pentamidina.

Além disso existem a Dapsona, Clindamicina, Primaquina, Atovaquona, Trimetrexato e Eflornitina. Todos estes fármacos são eficazes administrados isoladamente ou em combinação. O quadro 1 apresenta os fármacos, as doses, as posologias e as vias de administração e algumas precauções a ter (Matos *et al.*,2021).

Quadro 1. Fármacos para tratamento da PPC (baseado em Matos *et al.*, 2021)

Medicamentos	Dose	Posologia	Via de administração
	Tratamento de referência		
TMP-SMX	15-20 mg/kg/dia 75-100 mg/kg/dia	Cada 6 Horas ou 4 tomas diário	Oral e Endovenosa Intramuscular ou Endovenosa (a)
Pentamidina	3-4 mg/kg/dia	*****	
Tratamento alternativo			
Primaquina + Clindamicina	30 mg + 600mg	Cada 6 Horas ou 4 tomas diário	Oral
Primaquina + Clindamicina	30mg+ 900mg	Cada 8Horas ou 3 tomas diária	Endovenosa
Primaquina + Clindamicina	30mg+ 300mg	Cada 6 Horas ou 4 tomas diário	Oral
Primaquina + Clindamicina	30mg+ 450mg	Cada 8Horas ou 3 tomas diária	
Atovaquona	750 mg	Cada 12 Horas ou 2 tomas diária	Oral

(a) Administrar de preferência por via endovenosa com período máximo de uma a duas horas.

O tratamento da causa pode ser potenciado com uso de corticoides, com a finalidade de diminuir a inflamação e a evolução para fibrose, levando à obstrução alveolocapilar que consequentemente evolui para hipoxemia, mas esse tratamento só é recomendado nas formas graves. (Matos, *et al.*,2021).

1.3.7 Profilaxia

Aos seropositivos para VIH, a profilaxia é recomendada para todos que têm a contagem de células TCD4⁺ <200/mm³ seja adulto ou adolescente, e também as crianças cujas mães são VIH-positivas, devem iniciar as suas profilaxias desde as 4 semanas de

vida. (Matos *et al.*, 2021). Abaixo, no quadro 2 estão descritos os medicamentos usados na profilaxia (Matos *et al.*, 2021).

Quadro 2. Fármacos para a profilaxia da PPC (baseado em Matos *et al.*, 2021)

Medicamentos	Dose	Posologia	Via de administração
Profilaxia de referência			
TMP-SMX	960mg	Forte -1 cmp/dia ou 3comp/semana Simples-1comp/dia	Oral
Dapsona	50mg	2cmp/dia ou 100mg/dia em toma única	
Profilaxia alternativa			
Dapsona+	50mg	Tomar os três medicamentos/semana	Oral
Pirimetamina+	50mg		
Leucovorina	25mg		
Dapsona+	200mg	Tomar os três medicamentos/semana	
Pirimetamina+	75mg		
Leucovorina	25mg		
Pentamidina aerosol	300mg 60mg	300mg/mês 60mg/15dias, após 2 doses de 300mg/mês	Nebulização
Atovaquona	1500mg	1500mg/dia	Oral

Na profilaxia secundária ou terapêutica de manutenção a administrar aos indivíduos com histórico de PPC, recomenda-se a primeira opção da tabela descrita acima TMP-SMX, até que haja reconstituição imunitária conseguida através da TARV.

A profilaxia secundária, deve ser interrompida seguindo as recomendações para descontinuação da profilaxia primária (Matos *et al.*, 2021).

1.4 Objetivos

Na República da Guiné-Bissau existe uma total falta de informação sobre a existência de casos de PPC, uma infecção oportunista tão importante com elevadas taxas de morbilidade e mortalidade na população imunocomprometida, principalmente nos VIH-positivos, e também não há nenhuma informação sobre a existência de infecção assintomática por *P. jirovecii*. Por outro lado, a TB pulmonar é uma importante causa de morte na população deste país (Kühle *et al.*, 2022), com grande relevo para a população

seropositiva para VIH. Estes dados levaram o autor deste trabalho de tese de mestrado a realizar o primeiro levantamento, neste país, sobre a existência de casos de infecção por *P. jirovecii* em doentes seropositivos para VIH com sintomatologia respiratória e suspeita de TB pulmonar. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- Determinar a presença de infecção por *P. jirovecii* nos pulmões de doentes com serologia positiva para VIH e com suspeita de TB pulmonar;
- Determinar as características clínicas e epidemiológicas desta infecção neste grupo de doentes;
- Caracterizar os fatores de risco associados ao aparecimento de infecção por *P. jirovecii* nos doentes seropositivos para VIH com suspeita de TB pulmonar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do Estudo

O estudo foi realizado no Hospital Raoul Follereau (Bissau), e Mal de Hansen (Cumura), Guiné-Bissau, no Serviços da consulta externa e nas salas de internamentos. As amostras biológicas foram processadas em dois locais (laboratório do Hospital Raoul Follereau-Guiné-Bissau e laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do IHMT, UNL, Portugal).

2.2 Desenho do Estudo

Sessenta e uma (61) amostras de expetoração espontânea de doentes seropositivos para VIH, com confirmação laboratorial ou suspeita de TB pulmonar, seguidos nos Hospitais Raoul Follereau e Mal de Hansen, foram recolhidos de 25 de março a 13 de julho de 2022, na República da Guiné-Bissau.

2.3 População do Estudo

A população do estudo corresponde a doentes seropositivos para VIH com suspeita ou confirmação de TB pulmonar, seguidos no Hospital Raoul Follereau e Hospital Mal de Hansen, República da Guiné-Bissau.

2.3.1 Critérios de Inclusão no estudo

- a) Doentes com idade igual ou superior a 18 anos.
- b) Doentes seropositivos para VIH, confirmados laboratorialmente, com suspeita de infeção por *M. tuberculosis* por achados clínicos, laboratoriais e/ou imagiológicos sugestivos.
- c) Doentes seropositivos para VIH, confirmados laboratorialmente, com diagnóstico clínico e/ou bacteriológico de tuberculose pulmonar.
- d) Doentes adultos que acederam participar no estudo, tendo assinado o respetivo consentimento informado para participar no estudo.

2.3.2 Processamento da informação clínica e epidemiológica

As informações clínicas e epidemiológicas analisadas neste estudo foram obtidas através do formulário (anexo nº1) solicitado aos doentes incluídos no estudo, e que foi previamente aprovado pelo Comité Nacional da Ética da República da Guiné-Bissau e do IHMT. Os dados recolhidos para cada doente foram: género, idade, raça, etnia, infeção por TB, outras infeções (presença de tosse), terapêutica anti-bacilar, antecedente de PPC (diagnóstico clínico, não confirmado laboratorialmente), profilaxia da PPC, contagem de células TCD4⁺ (não se conseguiu obter por não ser feita a contagem nos hospitais envolvidos no estudo), nível de LDH (não se conseguiu obter por não ser feita a medição nos hospitais envolvidos no estudo), nível de PaO₂ (medido com oxímetro de pulso), padrão de Raio-x do tórax, diagnóstico de VIH, tempo de diagnóstico de VIH, TARV, diagnóstico de saída, comportamento de risco.

O género: duas categorias masculinas e femininas.

Idade: três grupos etários (18-38 anos; 39-59 anos; ≥ 60 anos).

As etnias: descritas são 11 de acordo com etnias presentes na República da Guiné-Bissau: ``Mansonca, Pepel, Fula, Mandinga, Mancanha, Manjaca, Nalu, Balanta, Bijagós, Biafada e Felupe``.

Infeção por TB pulmonar: quando foi detetado DNA de bacilos de tuberculose através do exame laboratorial (Gene xpert) é considerado positivo. No que concerne a comorbilidades, ou seja, à presença de outras infeções, estas foram na sua maioria confirmadas clinicamente, com exceção da malária e da toxoplasmose, cuja confirmação foi laboratorial.

A **duração de terapêutica anti bacilar** foi catalogada em duas fases, intensiva quando o tempo de tratamento não ultrapassa os dois meses e manutenção (continuação) quando esse tempo excede dois meses, e vai até 6 meses de tempo total para tratamento de bacilos não resistentes. (Mitchison e Davies, 2012).

Antecedentes de PPC: é considerado quando, previamente, um individuo tenha apresentado um quadro clínico sugestivo de PPC e que tenha sido diagnosticado laboratorialmente com infeção por *P. Jirovecii*.

Profilaxia anti-PPC: segundo Matos *et al.* (2021), a profilaxia deve ser administrada até que a reconstituição imunológica seja alcançada, com o apoio da TARV. Ainda, adultos

VIH-positivos devem receber quimioprofilaxia contra a PPC se tiverem contagens de células TCD4⁺ <200/mm³ ou história de candidíase orofaríngea (Matos *et al.*, 2021). TMP-SMX é a terapia de combinação recomendada na dose profilática de um comprimido de dose dupla diária, o qual confere proteção cruzada contra toxoplasmose e muitas infecções bacterianas respiratórias.

Contagem de células TCD4⁺ (≤ 200 céls./mm³ nos doentes com PPC): é importante na avaliação inicial, para monitorizar a eficácia do tratamento e detetar precocemente problemas de adesão ao tratamento (Matos *et al.*, 2021).

Nível de LDH: sendo um elemento de prognóstico serve para avaliar o estado imunitário e a resposta terapêutica, porém só quando há aumento do seu nível na fase inicial da doença sendo um dos elementos do diagnóstico presuntivo (Matos *et al.*, 2021).

Tempo de diagnóstico da infecção por VIH: foi subdividido em dois períodos: < 1 ano e ≥ 1 ano.

TARV: é considerada sim se está instituída, e não no caso contrário.

Diagnóstico de saída: de acordo com a avaliação médica.

Comportamento de risco: duas categorias heterossexuais (pessoas que praticam atividade sexual com o género oposto) e homossexual (homem que pratica atividade sexual com homem).

2.4 Métodos

2.4.1 Colheita das amostras

A colheita das 61 amostras de expetoração espontânea foi feita para contentores estéreis de boca larga. A expetoração foi colhida de manhã, em jejum, após o doente lavar a boca, gargarejando só com água para reduzir a contaminação da flora orofaríngea e todas as amostras com saliva e corrimento nasal foram descartadas. As amostras recolhidas diariamente foram refrigeradas a 9°C.

2.4.2 Processamento das amostras de expetoração espontânea (Laboratório na Guiné-Bissau)

Num passo inicial, adicionou-se, às amostras, água destilada estéril até perfazer o volume de 15 ml. Com auxílio de um vórtex agitou-se a amostra até homogeneizar a mistura. De seguida, as amostras liquefeitas foram levadas a centrifugar (Sigma) a 5000 rpm, durante 20 minutos. A maior parte do sobrenadante foi rejeitado, seguindo-se a ressuspensão do sedimento em cerca de 4 ml de sobrenadante. O volume da amostra foi dividido para dois microtubos de 2 ml. Estes microtubos com a amostra concentrada foram mantidos a 9°C, até ao transporte para o IHMT-NOVA.

As amostras biológicas foram transportadas, devidamente acondicionadas, com a documentação necessária, desde o laboratório na Guiné-Bissau até ao IHMT-NOVA, Portugal, onde se procedeu à continuação da metodologia de diagnóstico laboratorial adotada para este estudo.

2.4.3 Identificação de *Pneumocystis jirovecii* em expetoração espontânea por técnica de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM)

No IHMT-NOVA – A identificação de *P. jirovecii* foi feita por técnica de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IF-AcM). Para o efeito, foi utilizado um protocolo comercial (MonoFluo® *P. jirovecii* IFA test Kit, BioRad) e a técnica foi executada com base nas instruções do fabricante: as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, e efetuou-se um esfregaço com aproximadamente 50 µl de amostra cada, em lâminas de microscopia pré-tratadas com poli-L-lisina. Os esfregaços, foram secos à temperatura ambiente e, de seguida, fixados com acetona durante 10 minutos. Seguiu-se a adição cerca de 20 µl de reagente de coloração a cada esfregaço, que contem anticorpos monoclonais marcados (produzido e purificados a partir de ratos) com isotiocianato de fluoresceína (FITC) que reagem com as diversas formas do microrganismo (formas quísticas e formas tróficas), e procedeu-se à incubação, em câmara húmida, na estufa a 36°C, durante 35 minutos. De seguida o esfregaço foi lavado com água desionizada e deixado a secar. No final aplicou-se uma a duas gotas de meio de fixação sobre a lâmina e por cima do esfregaço colocou-se uma lamela. A visualização

de cada esfregaço foi efetuada no microscópio ótico de fluorescência, no comprimento de onda de 475 nm (Lautenschlager *et al.*, 1996).

2.4.4 Detecção molecular de *Pneumocystis jirovecii*

Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA genómico de *P. jirovecii* foi extraído, recorrendo-se ao QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen), de acordo com as indicações do fabricante.

Procedimento:

1. Em tubo eppendorf de 1,5ml adicionou-se 200µl da amostra a testar, 20µl de proteinase K e 200 µl de tampão AL e homogeneizou-se vigorosamente no vórtex.
2. Incubou-se a 56°C, durante 10 minutos, com homogeneização no vórtex a cada 5 minutos.
3. Adicionou-se 200µl de etanol (96-100%) e agitou-se bem no vórtex.
4. Transferiu-se 600µl da mistura para a coluna (QIAamp spin column) e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Repetiu-se este passo até que toda a mistura fosse filtrada na membrana.
5. Adicionou-se à coluna 500µl do tampão AW1 e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto e desprezou-se o filtrado.
6. Adicionou-se à coluna 500µl do tampão AW2 e centrifugou-se a 14 000 rpm durante 3 minutos e desprezou-se o filtrado.
7. Para garantir a eliminação total dos reagentes de lavagem fez-se uma nova centrifugação da coluna por 3 minutos.
8. Transferiu-se a coluna para um novo tubo *eppendorf* e adicionou-se cuidadosamente à coluna 100µl do tampão AE no centro da matriz de sílica e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Centrifugou-se o tubo, contendo a coluna, a 8000rpm durante 2 minutos, desprezou-se a coluna e guardou-se o tubo contendo a amostra do DNA a -20°C.

Deteção de *P. jirovecii* em espécimes respiratórios por PCR-nested.

Após extração do DNA genômico do microrganismo, as amostras foram submetidas a amplificação de um fragmento com 263 pb, que codifica o ácido ribonucleico (RNA) da subunidade grande do ribossoma mitocondrial (LSU-mtrRNA) de *P. jirovecii*, através de uma PCR-nested, descrita anteriormente por outros autores (Wakefield *et al.* 1990; Tamburrini *et al.* 1996, Matos *et al.*, 1999; Matos *et al.*, 2006

A técnica de PCR-nested é uma variante da técnica da PCR simples, que tem como objetivo amplificar uma determinada região alvo de DNA do microrganismo, utilizando os produtos do DNA amplificados na primeira reação, como molde para uma segunda reação. Esta técnica usa um par de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) na primeira etapa, seguida por uma segunda reação com recurso a um par de oligonucleótidos iniciadores diferentes do anterior, mais interno, e que têm como região alvo o primeiro produto de DNA amplificado. Esta técnica tem como vantagem relativamente à PCR simples o aumento da especificidade e sensibilidade da técnica de PCR (Mothershed e Whitney, 2005).

O quadro 3 apresenta as sequências dos *primers* utilizados na amplificação do gene *mtLSUrRN* de *P. jirovecii* do PCR-nested, e suas características (dimensão do oligonucleótido), temperatura de hibridação, designada por T_A, conteúdo em CG e tamanho do fragmento de amplificação.

Quadro 3 . Sequências nucleotídicas e características (dimensão do oligonucleótido, temperatura de hibridação/TA, conteúdo em CG e tamanho do fragmento de amplificação) dos primers utilizados para amplificação do gene *mtLSUrRN* de *P. jirovecii*.

PCR	Primer	Sequência (5'→3')	Dimensão (pb)	T _A (°C)	CG (%)	Amplificação (pb)
1 ^a	pAZ 102-E	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	20	59,4	55	346
Parte	pAZ 102-H	GTGTACGTTGCAAAGTACTC	20	55,3	45	
2 ^a	pAZ 102-X	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	22	56,5	41	263
Parte	pAZ 102-Y	TCACTTAATATTAATTGGGGAGC	23	55,3	35	

A primeira e a segunda reação de amplificação foram efetuadas num volume total de 25µl, contendo cada um dos seguintes componentes: por cada amostra, preparou-se uma mistura de amplificação contendo 1x tampão de reação (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,01% tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada *primer* (pAZ 102-E e pAZ 102-H na 1ª parte; pAZ 102-X e pAZ 102-Y na 2ª parte; MWG Biotech), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Bioline), 0,75 U de Biotaq™ DNA polimerase (Bioline), 0,01 µg/µl de albumina sérica bovina, BSA do inglês *bovine serum albumin* (Sigma), 2 µl de DNA genómico, obtido após extração pela técnica de QIAamp DNA Mini Kit , e água desionizada estéril. Para monitorizar a qualidade dos resultados, em cada ensaio de amplificação, foram incluídos, um controlo positivo (suspensão de DNA de *P. jirovecii*) e um controlo negativo (água desionizada estéril), substituindo, nas respetivas reações, os 2 µl de DNA genómico das amostras. As componentes térmicas da reação, encontram-se descritas no quadro 4, e foram aplicadas num termociclador (T1 Thermocycler; Biometra).

Quadro 4. Condições da reação de amplificação do gene *mtLSUrRNA* de *P. jirovecii*

Condições de amplificação*		
Desnaturação inicial	95°C, 3 minutos	x40 Ciclos
Desnaturação	95°C, 1,5 minutos	
Ligação	55°C, 1,5 minutos	
Extensão	72°C, 2 minutos	
Extensão Final	72°C, 10 minutos	

*as condições térmicas de amplificação são iguais na 1ª e na 2ª parte do PCR-*nested*

2.4.5 Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos na segunda reação da PCR-*nested* para o gene alvo em estudo foram posteriormente submetidos a uma eletroforese em gel de agarose SeaKem® LE (FMC BioProducts) a 1,5% em tampão Tris – Acetato – EDTA (TAE) 1x (40x mM Tris-Acetato; 1mM EDTA; pH 8,3). A eletroforese em gel é um método de separação de uma mistura de moléculas através de uma fase estacionária (agarose ou

poliacrilamida) submetida a um campo elétrico. Os produtos de PCR são carregados em poços moldados durante a preparação do gel e, de seguida aplica-se um campo elétrico para separar os amplicões, de acordo com os respectivos pesos moleculares. As frações separadas são visualizadas por ação de luz ultravioleta, num transiluminador (ECX-20.M; Vilber Lourmat) e os resultados foram registados com uma máquina fotográfica digital do sistema de aquisição de imagem incorporado ao transiluminador (PowerShot A710 IS; Canon). O DNA intercalado com as moléculas de brometo de etídio torna-se fluorescente devido à presença deste composto químico, que caracteristicamente, fica excitado, emitindo fluorescência quando lhe é incidida radiação ultravioleta.

Procedimento:

1. Dissolveu-se 1,5g de agarose SeaKem® LE (FMC BioProducts) em 100mL de solução tampão TAE 1x (40x mM Tris-Acetato; 1mM EDTA; pH 8,3) e aqueceu-se no microndas até que a solução ficasse homogénea e transparente.
2. Adicionou-se 5 µl de Brometo de etídio (0,5 µg/ml, Merck®) e verteu-se o preparado para um suporte de eletroforese, onde previamente se colocou o pente apropriado para aplicação das amostras e deixou-se a polimerizar.
3. Posteriormente, colocou-se o gel na tina de eletroforese e encheu-se a tina com a solução tampão TAE 1x de modo que o gel ficasse completamente imerso.
4. De seguida, aplicaram-se as amostras nos vários poços. Cada amostra aplicada consistiu na mistura de 16µl do produto de PCR a analisar com 1,5µl de solução de aplicação loading tampão (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.6]) (Fermentas, Reino Unido) (Loading Dye Solution-Fermentas®). A migração dos produtos de PCR no gel foi realizada simultaneamente com um marcador de massa molecular de 100 bp (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, fermentas®), tendo-se adicionado a 1µl do marcador, 1,5 µl de 6 × DNA loading dye e 15µl de água desionizada estéril.
5. A migração dos fragmentos de DNA amplificados com uma voltagem constante de 100V durante 40 minutos, no Agarose Gel Electroforesis Systems (Bio-Rad®, França), constituído pela tina de eletroforese (SubCell® GT) e uma fonte alimentadora de corrente (Power Pac HC).

6. Por fim, realizou-se a visualização dos produtos amplificados no transiluminador sob luz ultravioleta (Viber Lourmat) devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado na cadeia de DNA. As bandas com tamanho correspondente ao fragmento esperado (263pb) foram consideradas positivas para a presença de DNA genômico de *P. jirovecii*.

2.4.6 Critério de positividade

Todas as amostras positivas obtidas quer apenas por uma das técnicas ou por ambas as técnicas de diagnóstico (IF-AcM e PCR-*nested* para amplificação do gene *mtLSUrRNA* de *P. jirovecii*) utilizadas foram considerados casos positivos para *P. jirovecii*.

2.4.7 Análise dos dados

Os dados foram armazenados em software Excel 2016, e processados no software SPSS v.20. O teste de Chi-quadrado (χ^2) foi aplicado para investigar a associação entre variáveis qualitativas com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre as variáveis em estudo. Os dados foram agrupados em tabelas de contingência de duas entradas e a análise efetuada com intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados demográficos e clínicos

Inicialmente, 90 doentes provenientes de dois hospitais na República da Guiné-Bissau, Reaoul Folereau e Mal de Hansen começaram por participar no estudo. No final do estudo só se conseguiu recolher amostras biológicas de expetoração espontânea de 61 doentes. Motivo pelo qual foram retirados 29 doentes do estudo. Dos 61 doentes que participaram no estudo, provenientes de dois hospitais na República da Guiné-Bissau, Reaoul Folereau e Mal de Hansen, 72,1% (44/61) estavam hospitalizados e 27,9% (17/61) provinham da consulta externa. Destes doentes 59% (36/61) pertenciam ao género feminino e 41% (25/61) do género masculino. A idade média dos doentes registados foi de 40 anos. A totalidade dos indivíduos é de raça negra e declarou ser heterossexual. De acordo com a etnia, 26,2% (16/61) pertenciam à etnia *Balanta*; 24,6% (15/61) à etnia *Fula*, 21,3% (13/61) à *Mandinga*; 6,6% (4/61) à *Bijagos*; 4,9% (3/61) à *Mancanha*; para as etnias *Pepel*, *Biafada*, *Mandjaco* e *Nalu*, registaram todas uma frequência de 3,3% (2/61), e as etnias *Felupe* e *Mansonca* observaram-se ambas 1,6% (1/61) (Quadro 5).

Quadro 5. Dados demográficos dos 61 doentes confirmados ou com suspeito de Tuberculose pulmonar

Variáveis	% (n)
Género	
Masculino	41(25)
Feminino	59 (36)
Idade	
18-38	42,6 (26)
39-59	50,8 (31)
≥ 60	6,6 (4)
Raça	
Negra	100 (61)
Comportamento risco	
Heterossexual	100 (61)
Etnias	% (n)
Balanta	26,2 (16)
Biafada	3,3 (2)
Bijagos	6,6 (4)
Fula	24,6 (15)
Felupe	1,6 (1)
Mancanha	4,9 (3)
Mandinga	21,3 (13)
Manjaca	3,3 (2)
Mansonca	1,6 (1)
Nalu	3,3 (2)
Pepel	3,3 (2)
Total	100 (61)

Todos os 61 doentes estudados queixavam-se de tosse e 70,5% (43/61) tinham

tuberculose pulmonar confirmada laboratorialmente por GeneXpert e todos estavam sob terapêutica anti bacilar, incluindo quatro doentes que foram diagnosticados clinicamente. A maioria, 77% (47/61) encontrava-se na fase intensiva, enquanto 4,9% (3/61) dos doentes encontravam-se na fase de manutenção da terapêutica anti bacilar (Quadro 6).

Quadro 6. Dados clínicos dos 61 doentes com suspeita ou confirmação de tuberculose pulmonar, incluídos neste estudo.

Variáveis	% (n)
Infeção por TB	
Sim	70,5 (43)
Não	29,5 (18)
Outras infeções	
Sim	21,3 (13)
Não	78,7 (48)
Terapia anti-bacilar	
Não	18 (11)
Intensiva	77 (47)
Manutenção	4,9 (3)
Outras infeções (tipos)	
Toxoplasmose	3,3 (2)
Malária	3,3 (2)
Candidíase Oral	3,3 (2)
PPC	4,9 (3)
Cand. orofaríngea e Hepatite-B	1,6 (1)
Herpes zoster e Cand. oral	1,6 (1)
Sarcoma de Kaposi	3,3 (2)
Total	100 (61)

Cand: candidíase

Uma percentagem de 4,9% (3/61) dos doentes estudados era suspeita de apresentar coinfeção por *P. jirovecii* (diagnóstico clínico). Outras comorbilidades foram igualmente registadas, tais como, toxoplasmose, malária, candidíase oral, Sarcoma de Kaposi cada uma com 3,3% (2/61), e com menor frequência foi observada candidíase orofaríngea associada a hepatite B e candidíase oral associada a Herpes Zóster, ambas com 1,5% (1/61) (Quadro 6). Os 4,9% (3/61) de doentes diagnosticados clinicamente como tendo PPC estavam sob terapêutica anti-*P. jirovecii* com cotrimoxazol 960mg (um comprimido cada oito horas com duração média de 14 dias). A saturação de oxigénio, no sangue foi medida com o auxílio de um oxímetro de pulso, em 52 doentes, tendo sido registada uma percentagem média de 97,5% (Quadro 7). A radiografia do tórax, só foi

possível obter em 57% (35/61) da população estudada. Os padrões de Rx observados foram: infiltrado intersticial difuso em 19,7% (12/61) dos doentes; frequências idênticas de padrão normal e padrão com lesões cavitárias de 9,8% (6/61); padrão intersticial difuso associado a lesões cavitárias em 4,9% (3/61); lesões cavitárias associadas com derrame pleural em 3,3% (2/61) dos doentes e igual frequência de doentes com padrão intersticial difuso associado com micronodular; e padrão intersticial difuso associado a derrame pleural em 1,6% (1/61) que corresponde a um doente (Quadro 8).

Quadro 7. Nível de PaO₂ no sangue dos 52 doentes que apresentaram o resultado deste teste no relatório clínico.

Nível de PaO ₂ (%)	% (n)
94	6,6 (4)
95	6,6 (4)
96	11,5 (7)
97	9,8 (6)
98	31,1 (19)
99	3,3 (2)
100	16,4 (10)
Não disponível	14,8 (9)
Total	100 (61)

Dos 61 doentes estudados, 78,7% (48/61) faziam profilaxia com cotrimoxazol 960mg diário com uma média de 14, 15 dias, e os restantes 21,3% (13/61) dos doentes não faziam esta profilaxia (Quadro 9).

É de ressaltar que toda a população estudada foi positiva para VIH, sendo a maioria (75,4%; 46/61), conhecedora da seropositividade para VIH há menos de três meses, enquanto 24,6% (15/61) tinham sido informados da sua seropositividade para VIH há mais de um ano. Dos 61 doentes estudados 55,7% (34/61) faziam TARV, enquanto os restantes 44,3% (27/61) não estavam sob esta terapêutica. Entre os doentes em TARV 31,1% (19/61) estavam num período de tratamento inferior a três meses,

comparativamente aos 24,6% (15/61) que já se encontravam sob TARV à mais de um ano.

Quadro 8. Padrão de raio-x dos 35 doentes com informação radiológica, incluídos neste estudo.

Padrão de Raio-X	% (n)
Normal	9,8 (6)
Intersticial difuso	19,7(12)
Micronodular	3,3 (2)
Lesões cavitárias	9,8 (6)
Derrame pleural	1,6 (1)
Lesões cavitárias e Derrame pleural	3,3 (2)
Intersticial difuso e Lesões cavitárias	4,9 (3)
Intersticial difuso e Micronodular	3,3 (2)
Intersticial difuso e Derrame pleural	1,6 (1)
Não fez	42,6 (26)
Total	100 (61)

No diagnóstico de saída a maioria dos doentes apresentou: associação VIH e TB pulmonar com 70,5% (43/61); apenas infeção por VIH em 21,3% (13/61); infeção por VIH, TB e PPC (diagnóstico clínico) em 4,9% (3/61); e infeção por VIH associada a pneumonia comunitária em 3,3% (2/61) dos doentes (**Quadro 9**).

Quadro 9. Dados clínicos (período de diagnóstico de VIH, administração de TARV, profilaxia e terapêutica de pneumocistose, e diagnóstico de saída) dos 61 doentes com confirmação ou com suspeita de tuberculose pulmonar, incluídos neste estudo.

Variáveis	% (n)
Antecedente de PPC	
Não	100 (61)
Terapia anti- <i>P. jirovecii</i>	
Sim	4,9 (3)
Não	95,1 (58)
Posologia e dose	
TMP-SMX 960mg c/8h	4,9 (3)
Não	95,1 (58)
Profilaxia anti- <i>P. jirovecii</i>	
Sim	78,7 (48)
Não	21,3 (13)
Posologia e dose	
TMP-SMX 960mg/dia	78,7 (48)
Não	21,3 (13)
Período de diagnóstico VIH	
< 1 Ano	75,4 (46)
> 1 Ano	24,6 (15)
TARV	
Sim	55,7 (34)
Não	44,3 (27)
Duração do TARV	
< 1 Ano	31,1 (19)
> 1 Ano	24,6 (15)
Não começou	44,3 (27)
Diagnóstico de saída	
VIH	21,3 (13)
VIH e TB	70,5 (43)
VIH, TB e PPC	4,9 (3)
VIH e Pneumonia comunitária	3,3 (2)
Total	100 (61)

TMP-SMX, Trimetoprim- Sulfametoxazol ou cotrimoxazol

3.2 Detecção de *Pneumocystis jirovecii*: imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IF-AcM) e PCR-*nested* tendo como alvo o gene que codifica a mt(LSU)rRNA de *P. jirovecii*.

De acordo com o critério de positividade estabelecido inicialmente para este estudo *P. jirovecii* foi detectado em 26,2% (16/61) das amostras estudadas, com as técnicas de diagnósticos utilizadas. A técnica de PCR-*nested* registou 81,25% (13/16) de casos positivos e 6,25% (1/16) dos casos positivos foram detectados apenas por IF-AcM. Ambas as técnicas detetaram simultaneamente 12,5% (2/16), de casos positivos. (Quadro 10).

Através da técnica de IFI-AcM, os quistos de *P. jirovecii* apresentaram forma esférica e dimensão média de 4 a 6 μm , com a parede celular corada de verde fluorescente (figura 5)

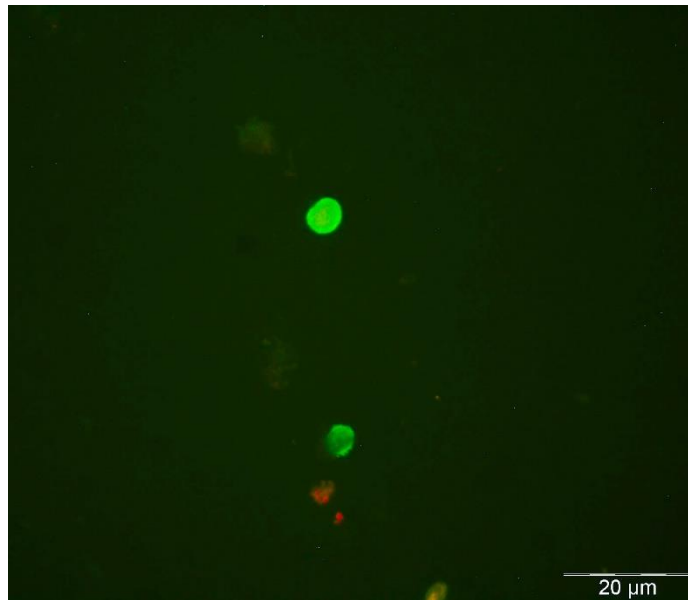


Figura 5. Quistos de *P. jirovecii*, visualizados pela técnica de IFI-AcM, em expectoração espontânea ($\times 1000$) (original do autor).

As 61 amostras de expectoração espontânea foram, posteriormente, submetidas à amplificação de DNA específico de *P. jirovecii*, nomeadamente de um fragmento de 263 pb do gene que codifica a mt(LSU) rRNA (Wakefield *et al.* 1990; Tamburrini *et al.* 1996, Matos *et al.*, 1999; Matos *et al.*, 2006), como era esperado, e alguns exemplares são ilustrados na figura 6.

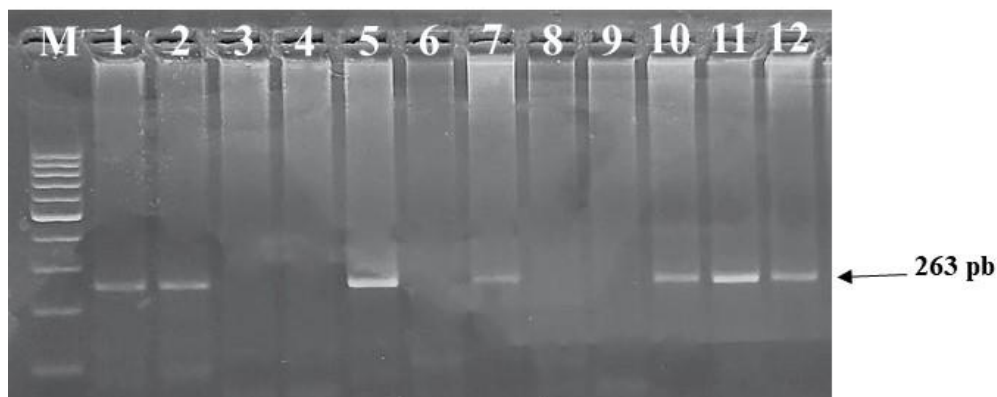


Figura 6. Separação electroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos do nested-PCR de um fragmento de 263 pb do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial. Linhas 5, 7 e 10 a 12 – Amostras estudadas positivas, linhas 6, 8 e 9 amostras negativas estudadas, linhas 1 e 2 - controlo positivo, linhas 3 e 4 – controlo negativo, M – Marcador de peso molecular de 100 pb Sigma-Aldrich®, Alemanha.

Entre o número de 16 doentes com amostras de expectoração espontânea positivas para *P. jirovecii*, a maioria eram do género feminino 62,5% (10/16) e 37,5% (6/16) do género masculino. De entre estes doentes positivos 50% (8/16) tinham idades entre 18 e 38 anos todos eram da raça negra, e predominavam as etnias *Balanta* e *Mandinga* ambas com 31,3% (5/16), seguida pela *Fula* com 18,8% (3/16), e as *Bijagos*, *Mancanha* e *Biafadas* com 6,3% (1/16) casos cada. Em 68,8% (11/16) dos doentes positivos para *P. jirovecii* foi igualmente diagnosticada tuberculose. Toxoplasmose (3/16), herpes zóster (3/16) e sarcoma de Kaposi (3/16) foram comorbilidades registadas em 18,8% dos doentes positivos para *P. jirovecii*, em que as duas últimas comorbilidades foram diagnosticadas clinicamente. Em 75% (12/16) dos doentes positivos para *P. jirovecii* era administrada terapia anti bacilar, dos quais 62,5% (10/12) encontravam-se na fase intensiva (dura 2 meses) e 12,5% (2/12) na fase de manutenção terapêutica (dura 4 meses). Os restantes 25% (4/16) não estavam sob terapêutica anti bacilar.

Dos 75% que faziam terapêutica anti bacilar, 50% (6/16) recebiam uma dose de três comprimidos diária que continha isoniazida 225mg, rifampicina 450mg pirazanamida 1200 mg e etambutol 825 mg (fase intensiva).

Quadro 10. Presença de *P. jirovecii* em amostras de expectoração espontânea, observada por técnica de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (IF-AcM) e PCR-nested (gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii*), de doentes com confirmação ou com suspeita de tuberculose pulmonar, incluídos neste estudo.

Técnicas	<i>P. jirovecii</i>		Total
	Positivo % (n)	Negativo % (n)	% (n°)
IF – AcM e/ou PCR-nested	26,2 (16)	73,8 (45)	100 (61)
IF – AcM	4,9 (3)	95,1 (58)	100 (61)
PCR-nested	24,6, (15)	75,4 (46)	100 (61)
IF – AcM e PCR-nested	3,3 (2)	96,7 (59)	100 (61)

Nenhum dos doentes positivos para *P. jirovecii* tinha sido previamente diagnosticado com PPC (diagnóstico clínico). Apenas um doente, durante o acompanhamento foi diagnosticado clinicamente, e na altura da colheita da amostra biológica encontrava-se sob terapêutica anti- *P. jirovecii* (cotrimoxazol 960 mg cada oito horas durante 20 dias).

No quadro 11 encontram-se descritas a informação demográfica, clínica, laboratorial e parâmetros da doença correspondentes aos 16 doentes positivos para *P. Jirovecii*, identificados no estudo.

Quadro 11. Informação demográfica, clínica, laboratorial e parâmetros da doença correspondentes aos 16 doentes positivos para *Pneumocystis jirovecii*, identificados no estudo.

ID	I/CE	G	Grupo etário	Etnia	CR	TB	TAB	OI	PaO ₂	Padrão de raio-X	Inf. clínica	Profilaxia anti-Pj	Diagnóstico de saída	TA RV	IF	PCR	Pos*
2	I	F	39-59	Balanta	Het	Sim	Sim	Não	96	Lesões cavitárias	Tosse	Sim	VIH, TB	Sim	-	+	+
7	I	F	39-59	Mandinga	Het	Sim	Sim	Sim	98	Não fez	Tosse	Sim	VIH, TB, Toxo	Sim	-	+	+
8	I	F	18-38	Mandinga	Het	Sim	Sim	Não	95	Não fez	Tosse	Sim	VIH, TB	Sim	-	+	+
11	I	F	18-38	Balanta	Het	Sim	Sim	Não	N	Não fez	Tosse	Sim	VIH, TB	Sim	-	+	+
14	I	M	39-59	Balanta	Het	Sim	Sim	Não	N	Não fez	Tosse	Sim	VIH, TB	Não	+	+	+
18	CE	M	18-38	Mandinga	Het	Não	Não	Não	98	Normal	Tosse	Não	VIH	Não	-	+	+
26	CE	F	39-59	Mancanha	Het	Não	Não	Não	N	Normal	Tosse	Não	VIH	Sim	+	+	+
27	CE	F	18-38	Mandinga	Het	Não	Não	Não	98	Normal	Tosse	Não	VIH	Não	+	-	+
29	I	F	18-38	Fula	Het	Sim	Sim	Não	97	Lesões cavitárias	Tosse	Sim	VIH, TB	Sim	-	+	+
31	I	F	18-38	Balanta	Het	Não	Não	Não	97	Intersticial	Tosse	Não	VIH	Não	-	+	+
38	I	F	18-38	Balanta	Het	Sim	Sim	Não	98	Intersticial	Tosse	Sim	VIH, TB, PPC	Sim	-	+	+
39	I	M	39-59	Mandinga	Het	Sim	Sim	Sim	94	Intersticial	Tosse	Sim	VIH, TB	Sim	-	+	+
40	I	M	39-59	Fula	Het	Não	Sim	Sim	100	Intersticial	Tosse	Sim	VIH	Não	-	+	+
48	I	M	≥60	Fula	Het	Sim	Sim	Não	100	Intersticila	Tosse	Sim	VIH	Não	-	+	+
49	CE	F	18-38	Bijagos	Het	Sim	Sim	Não	100	Intersticial	Tosse	Não	VIH, TB	Não	-	+	+
52	I	M	39-59	Biafada	Het	Sim	Sim	Não	98	Lesões cavitárias	Tosse	Sim	VIH, TB	Não	-	+	+

ID: Identificação amostra; I: Internamento; CE: Consulta externa; G: género; F: Feminino; M: Masculino; CR: comportamento de risco; Het: Heterossexual; TB: Tuberculose pulmonar; TAB: terapia anti-bacilar; OI: outras infeções; IF: Imunofluorescência direta; Pos*: casos positivos para *P. jirovecii* segundo o critério de positividade adoptado no presente estudo.

3.3 Fatores associados à detecção de *P. jirovecii* nas amostras de expectoração espontânea dos 61 doentes estudados.

Na análise estatística tendo por objetivo avaliar possíveis associações entre a presença de *P. jirovecii* e algumas das variáveis demográficas e clínicas dos doentes estudados, com recurso ao teste de qui-quadrado e teste de Fisher, não foram observadas associações estatisticamente significativas.

No início deste estudo o autor tentou recolher um maior número de dados demográficos e clínicos dos doentes participantes, tendo esse esforço sido infrutífero por falta de exames feitos nos dois hospitais onde o estudo decorreu. Não foi possível fazer avaliação da associação entre a presença de *P. jirovecii* e as variáveis raça e comportamento de risco por serem variáveis com uma única categoria. Ainda, as variáveis, contagem de células TCD4⁺, nível de LDH, não se encontravam disponíveis no processo clínico dos doentes envolvidos no estudo. O facto de não termos conseguido analisar essas variáveis causa algumas limitações neste estudo.

Da análise das restantes variáveis embora sem significância estatística observou-se que os doentes do género feminino foram mais colonizados por *P. jirovecii* com 62,5% (10/36), comparativamente aos doentes do género masculino 37,5% (6/25) (Quadro 12). Quanto à presença de *P. jirovecii* na expectoração dos doentes distribuídos por grupos etários, observou-se que a maioria dos doentes positivos se encontravam no grupo etário dos 18-38 anos com 50,0% (8/16), seguida do grupo dos 39-59 anos com 43,8% (7/16) e, por último, a categoria ≥60 anos com 6,3 (1/16) (Quadro 13).

Quadro 12. Distribuição da frequência de *P. jirovecii* nas amostras de expectoração espontânea analisadas em relação ao género dos 61 doentes englobados no estudo.

		<u><i>P. jirovecii</i></u>		<u>Total</u>
		<u>N=61</u>		<u>% (n)</u>
		<u>% (n)</u>		
		<u>Sim</u>	<u>Não</u>	
<u>Género</u>	<u>Masculino</u>	37,5 (6)	42,2 (19)	41,0 (25)
	<u>Feminino</u>	62,5 (10)	67,8 (26)	59,0 (36)

$\chi^2=0,109$ P = 0,741

Quadro 13. Distribuição da frequência de *P. jirovecii* nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao grupo etário dos 61 doentes englobados no estudo.

		<u><i>P. jirovecii</i></u>		<u>Total</u>
		<u>N=61</u>		<u>% (n)</u>
		<u>% (n)</u>		
		<u>Sim</u>	<u>Não</u>	
<u>Grupo</u>	18-38	<u>50,0 (8)</u>	<u>40,0 (18)</u>	<u>42,6 (26)</u>
<u>etário</u>	39-59	<u>43,8 (7)</u>	<u>53,3 (24)</u>	<u>50,8 (31)</u>
	≥60	<u>6,3 (1)</u>	<u>6,7 (3)</u>	<u>6,6 (4)</u>

$\chi^2=0,493$ P= 0,781

As etnias *Mandinga* e *Balanta* registaram 31,3% (5/16) de doentes positivos para *P. jirovecii*, seguidas da etnia *Fula* 18,8% (3/16), e das etnias *Mancanha*, *Biafada* e *Bijagos* todas com 6,3% (1/16) (Quadro 14).

Quadro 14. Distribuição da frequência de *P. jirovecii* nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao grupo étnico dos 61 doentes englobados no estudo.

		<u><i>P. jirovecii</i></u>		<u>Total</u>
		<u>N=61</u>		<u>% (n)</u>
		<u>% (n)</u>		
		<u>Sim</u>	<u>Não</u>	
<u>Grupo étnico</u>	<i>Mansonca</i>	<u>0,0 (0)</u>	<u>2,2 (1)</u>	<u>1,6 (1)</u>
	<i>Pepel</i>	<u>0,0 (0)</u>	<u>4,4 (2)</u>	<u>3,3 (2)</u>
	<i>Fula</i>	<u>18,8 (3)</u>	<u>26,7 (12)</u>	<u>24,6 (15)</u>
	<i>Mandinga</i>	<u>31,3 (5)</u>	<u>17,8 (8)</u>	<u>21,3 (13)</u>
	<i>Mancanha</i>	<u>6,3 (1)</u>	<u>4,4 (2)</u>	<u>4,9 (3)</u>
	<i>Manjaca</i>	<u>0,0 (0)</u>	<u>4,4 (2)</u>	<u>3,3 (2)</u>
	<i>Nalu</i>	<u>0,0 (0)</u>	<u>4,4 (2)</u>	<u>3,3 (2)</u>
	<i>Balanta</i>	<u>31,3 (5)</u>	<u>24,4 (11)</u>	<u>26,2 (16)</u>
	<i>Bijagos</i>	<u>6,3 (1)</u>	<u>6,7 (3)</u>	<u>6,6 (4)</u>
	<i>Biafada</i>	<u>6,3 (1)</u>	<u>2,2 (1)</u>	<u>3,3 (2)</u>
	<i>Felupe</i>	<u>0,0 (0)</u>	<u>2,2 (1)</u>	<u>1,6 (1)</u>

$\chi^2= 5,024$ P= 0,890

A coinfeção TB pulmonar+*P. jirovecii*, foi registrada em 68,8% (11/43) dos doentes estudados, em comparação com 31,3% (5/18) dos doentes infectados por *P. jirovecii* que não apresentavam TB (Quadro 15).

Quadro 15 .Distribuição da frequência de *P. jirovecii* nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao diagnóstico de tuberculose pulmonar dos 61 doentes englobados no estudo.

		<u><i>P. jirovecii</i></u>		<u>Total</u>
		<u>N=61</u>		<u>% (n)</u>
		<u>% (n)</u>		
		<u>Sim</u>	<u>Não</u>	
<u>Tuberculose</u>	<u>Sim</u>	68,8 (11)	71,1 (32)	70,5(43)
<u>pulmonar</u>	<u>Não</u>	31,3 (5)	28,9 (13)	29,5 (18)

$\chi^2=0,032$ P =0,859

A maioria, 81,3 % (13/48)_dos doentes com *P. jirovecii* nas amostras de expetoração espontânea analisadas não apresentava outras coinfeções associadas, em comparação com 18,8% (3/13) com outras coinfeções (Quadro 16).

Quadro 16. Distribuição da frequência de *P. jirovecii* nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação ao diagnóstico de outras coinfeções dos 61 doentes englobados no estudo.

		<u><i>P.jirovecii</i></u>		<u>Total</u>
		<u>N=61</u>		<u>% (n)</u>
		<u>% (n)</u>		
		<u>Sim</u>	<u>Não</u>	
<u>Outras co-</u>	<u>Sim</u>	18,8 (3)	22,2 (10)	21,3 (13)
<u>infeções</u>	<u>Não</u>	81,3 (13)	77,8 (35)	78,7 (48)

$\chi^2=0,085$ P= 0,771

A maioria dos doentes estudados estava sob terapêutica profilática anti-*P. jirovecii* (78,7%). Igualmente, entre os 16 doentes positivos para *P. jirovecii* observou-se que a maioria, 68,8% (11/16) fazia profilaxia anti-*P. jirovecii* (cotrimoxazol 960mg, um comprimido diário, com uma duração média de 31 dias), comparativamente aos doentes positivos que não faziam profilaxia (Quadro 17).

Quadro 17. Distribuição da frequência de *P. jirovecii* nas amostras de expetoração espontânea analisadas em relação à administração de profilaxia anti-*P. jirovecii* dos 61 doentes englobados no estudo.

		<u><i>P. jirovecii</i></u>		<u>Total</u>
		<u>N=61</u>		<u>% (n)</u>
		<u>% (n)</u>		
		<u>Sim</u>	<u>Não</u>	
Profilaxia anti- <i>P. jirovecii</i>	<u>Sim</u>	68,8 (11)	82,2 (37)	78,7 (48)
	<u>Não</u>	31,3 (5)	17,8 (8)	21,3 (13)

$\chi^2 = 1,277$ P = 0,258

A deteção de *P. jirovecii* foi idêntica quer nos doentes em que era administrada terapêutica anti-retrovírica (TARV) com 50,0% (8/16) quer nos não sujeitos a este tratamento 50,0% (8/16) (Quadro 18).

Quadro 18. Distribuição da frequência de *P. jirovecii* na expetoração espontânea em relação à administração de terapêutica anti retrovírica (TARV) dos 61 doentes englobados no estudo.

		<u><i>P. jirovecii</i></u>		<u>Total</u>
		<u>N=61</u>		<u>% (n)</u>
		<u>% (n)</u>		
		<u>Sim</u>	<u>Não</u>	
TARV	<u>Sim</u>	50,0 (8)	57,8 (26)	55,7 (34)
	<u>Não</u>	50,0 (8)	42,2 (19)	44,3 (27)

$\chi^2 = 0,289$ P = 0,591

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A pneumocistose ou pneumonia por *P. pirovecii* (PPC) tem grande relevância e impacto no contexto da infecção por VIH, mas também nos doentes seronegativos para VIH com outras imunodeficiências.

A Europa e a América do Norte embora, atualmente, com pouca prevalência de casos de infecção por VIH, consideram a PPC como a principal doença definidora da sida (Matos, 2018). Na África subsariana, líder da prevalência de casos de infecção por VIH, a PPC é considerada uma doença emergente. Esse facto deve-se à inexistência, em vários países, de meios de diagnóstico para esta doença, ao facto de os doentes com sida não sobreviverem tempo suficiente para atingirem o nível de deficiência imunológica que leva ao desenvolvimento de infeções oportunistas como a PPC e a última razão prende-se com o deficiente acesso à TARV nestas regiões do globo (Matos, 2012). No entanto, nalgumas regiões em desenvolvimento, nos últimos anos, temos vindo a assistir a melhorias socioeconómicas e de saúde das populações que se têm vindo a repercutir numa melhoria dos recursos de diagnóstico das doenças oportunistas, nomeadamente da PPC, e de acesso à TARV (Wasserman *et al*, 2016).

A República da Guiné-Bissau sendo um país da África Ocidental com prevalência de VIH de 3,1% em adultos com 15 a 49 anos (UNAIDS 2021), não é uma exceção no que diz respeito aos recursos limitados na área do diagnóstico laboratorial das doenças oportunistas no contexto de VIH (Jespersen, *et al.*, 2020). Na maior coorte de VIH na República de Guiné-Bissau foram incluídas a pesquisa de algumas doenças oportunistas no contexto de VIH, com exceção da PPC (Jespersen *et al.*, 2015), relativamente à qual há um vazio sobre a sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento precoce neste país. Há que evitar o tratamento empírico da PPC, apenas baseado em dados clínicos e imagiológicos, os quais são inespecíficos, e ter uma abordagem baseada no diagnóstico laboratorial, ou seja, no diagnóstico definitivo.

Como tem sido relatado por vários autores, uma das causas da baixa prevalência de PPC em África é a limitação de recursos de diagnóstico neste continente, e isso leva a subestimar a verdadeira prevalência desta doença oportunista (Morris *et al.*, 2004; Matos, 2012)

Neste estudo pretendemos documentar a existência de casos de infecção por *P. jirovecii* na população de VIH-positivos, com suspeita de infecção por *M. tuberculosis* (TB), na República da Guiné-Bissau.

A percentagem de casos positivos para *P. jirovecii* entre os doentes incluídos neste estudo foi de 26,2% (16/61). Por outro lado, num estudo realizado na República Unida da Tanzânia (Atzori *et al.*, 1993) foi registada uma prevalência significativamente menor, de 3,6% (3/83) em doentes VIH-positivos, assim como noutro estudo realizado em Dakar (República do Senegal), em 2016 onde foi descrita uma prevalência de casos de PPC de 9% (16/183), igualmente em doentes VIH-positivos (Dieng *et al.*, 2016). Outros autores referem prevalências de casos de PPC inferiores à observada no nosso estudo: 3,9% (5/129) em doentes VIH-positivos, no Uganda (Taylor *et al.*, 2011) e 5,3% (25/475) na República de Namíbia, entre a população estudada (VIH-positivos e VIH-negativos) (Nowaseb *et al.*, 2014).

Por outro lado, na República do Malawi foi reportada uma prevalência de casos de PPC de 27% (14/51), em que 94% da população estudada era VIH-positiva (Hartung *et al.*, 2011). Em 2014, foi publicado um estudo efetuado na República de Camarões onde se observou uma prevalência de *P. jirovecii* (colonização) de 31,6% (75/237) numa população de VIH-positivos e negativos. No referido estudo foi registado um maior número de casos positivos de *P. jirovecii* entre a população VIH-positiva com 42,9% (54/126), relativamente ao grupo de VIH-negativos estudado, com 18,9% (21/111) (Riebold *et al.*, 2014). Na República de Zimbábue a percentagem de casos *P. jirovecii* positivos foi de 33% (21/64) entre doentes VIH-positivos, com pneumonia aguda difusa (Malin *et al.*, 1995).

Ao comparar a discrepância entre as prevalências descritas nos estudos referidos anteriormente, em comparação ao valor determinado neste estudo, sugerem-se algumas possíveis justificações (Anexo nº 03). Nos estudos que descrevem frequências de indivíduos positivos para *P. jirovecii* inferiores aos determinados no presente estudo, estes valores podem estar associados à menor sensibilidade das técnicas de diagnóstico usadas para a detecção do microrganismo: Atzori *et al.*, 1993 (Tanzânia) e Taylor *et al.*, 2011 (Uganda), usaram apenas microscopia óptica, após coloração histoquímica (Diff-

Quik, e/ou TBO). No estudo de Dieng *et al* (2016), a baixa frequência de casos de *P. jirovecii* pode estar relacionada não só com a técnica de detecção usada, a IFI-AcM (que neste caso foi a única metodologia adotada enquanto no nosso estudo usámos simultaneamente a PCR-nested) como a inclusão no grupo da população estudada de indivíduos seronegativos para VIH, onde à partida o número de casos de *P. jirovecii* será inferior ao da população VIH-positiva. Embora no estudo de Noawseb *et al* (2014), tenha sido usado o mesmo tipo de amostra (expectoração espontânea), assim como técnicas de detecção com sensibilidade semelhante, ao adoptado no nosso estudo, a baixa frequência descrita por esses autores, pode estar associada à inclusão de indivíduos VIH-negativos e ao tamanho da amostra estudado (muito superior ao do presente trabalho)

Nos estudos onde foram encontradas prevalências mais elevadas de *P. jirovecii* (Hartung *et al.*, 2011; Riebold *et al.*, 2014; Malin *et al.*, 1995), comparativamente às determinadas no presente estudo, embora em todos eles tenha sido usada metodologia de sensibilidade e especificidade semelhante à adoptada no presente estudo, a pesquisa do microrganismo foi detetada em amostras de LBA e/ou expectoração induzida, que são produtos susceptíveis de apresentar uma maior carga de formas quísticas e tróficas de *Pneumocystis*, do que é expectável observar na expectoração espontânea (o produto biológico usado no nosso estudo). Em geral, as técnicas de microscopia com recurso a métodos de coloração histoquímica para a detecção de *P. jirovecii* são substancialmente menos sensíveis que as moleculares, e especialmente quando se aplicam a material biológico como a expectoração espontânea (Bigby *et al.*, 1986; Aderaye *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2017).

Acrescente-se que, uma grande limitação à detecção de *P. jirovecii* esta associada na maioria das vezes à dificuldade de recolha de produtos biológicos de qualidade (nomeadamente lavado-broncoalveolar) do doente, em países de baixa renda.

A existência de coinfeção por *Mycobacterium tuberculosis* e *P. jirovecii* nos pulmões é uma ocorrência pouco comum, sendo relatada em até 40% dos casos de imunossuprimidos com PPC, incluindo doentes com VIH/sida (Orlovic *et al.*, 2001).

Como é sabido na Africa subsariana a TB é a causa mais comum de mortalidade e morbilidade (Maartens, 2002) e é considerada uma doença definidora de sida (Aaron *et al.*, 2004).

A TB é a infecção secundária mais comum nos seropositivos para VIH na República da Guiné-Bissau (FAAPA, 2019). Entretanto, no nosso estudo observámos que 18% (11/61) dos doentes com infecção por *P. jirovecii* tinham TB pulmonar confirmada. Outros autores afirmaram que em algum momento no futuro, as pessoas com VIH/sida poderão apresentar TB pulmonar e PPC concomitantes, especialmente em regiões híper endémicas para TB, como é o caso da República da Guiné-Bissau (Orlovic *et al.*, 2001).

A coinfeção TB/PPC é pouco relatada no contexto da imunossupressão por VIH tendo sido descrita em alguns estudos com valores de 0, 6% (3/475), na Namíbia (Nowaseb *et al.*, 2014), de 2,4% (2/83) na Tanzânia (Atzori *et al.*, 1993), e de 9,4% (6/64), no Zimbawe (Malin *et al.*, 1995).

A diferente prevalência de coinfeção citada nestes diferentes estudos, e comparativamente aos registados no presente trabalho, pode ser justificada pela utilização de diferentes meios de diagnóstico para ambas as infeções, assim como de diferentes espécimes biológicos analisados no caso específico da PPC, ao contrário do nosso estudo em que foi utilizada uma técnica molecular (Genex-Expert) no diagnóstico da TB, os restantes estudos adoptaram metodologia menos sensível, nomeadamente técnicas de coloração histoquímica (Ziehl-Neelsen ou Auramina O) e cultura (Nowaseb *et al.*, 2014; Atzori *et al.*, 1993; Malin *et al.*, 1995). Outra justificação para o baixo número de casos de doentes com presença simultânea de *P. jirovecii* e infecção por TB encontrado, nesses estudos pode estar relacionada com o subdiagnóstico da PPC (devido a múltiplos factores já aqui referidos) que ocorre em países de baixa renda.

No que se refere aos dados demográficos a população do género feminino foi mais afetada com 62,5% (10/16) de infetadas por *P. jirovecii*, com idade média de 41 anos (mínimo:18; máximo: 69). Comparativamente, num estudo realizado em República de Camarões numa população VIH-positiva e VIH-negativa, em que o objetivo era determinar a prevalência de PPC nesses grupos populacionais, verificou-se uma maior colonização de *P. jirovecii* da população VIH-positiva do que na população VIH-negativa (42,9% vs 18,9%). Entre os doentes VIH-positivos com idade média de 35 anos (mínimo:19; máximo: 62 anos), observou-se maior percentagem de infetados no género feminino do que no género masculino (81,7% vs 18,3%). No entanto, neste estudo a diferença de colonização por *P. jirovecii* entre géneros não foi estatisticamente significativa, o que pode estar associado à percentagem de doentes do género feminino

ter sido cerca de quatro vezes superior à população do género masculino estudada (Riebold, *et al.*, 2014). Noutro estudo na República do Zimbabwe (Malin *et al.*, 1995), cujo objetivo foi identificar fatores preditivos independentes de PPC e TB, utilizando amostras de lavado bronco-alveolar dos doentes VIH-positivos, os autores observaram uma percentagem ligeiramente superior à determinada no nosso estudo de 33% (21/64) de doentes com infeção por *P. jirovecii*, e desses só seis estavam coinfectados por TB.

Na República da Guiné-Bissau a população feminina, com idade compreendida entre 19 a 45 anos, tem uma taxa de prevalência de infeção por VIH de 4%, acima da taxa de infeção por VIH para o género masculino na mesma faixa etária (2,2 %) (UNAIDS 2021). O género feminino tem mais conhecimentos e maior aceitação dos resultados dos testes para pesquisa de VIH, conseguidos por meio de consultas pré-natais, em comparação com o género masculino (INE, 2020). Além disso, o género feminino representa 51,4% do total da população Guineense (Guiné-Bissau, 2009).

A variável grupo etário no nosso estudo não mostrou influência significativa na presença de infeção por *P. jirovecii*. O mesmo resultado foi observado na população de indivíduos VIH-positivos dos Camarões num estudo efetuado em 2014 (Riebold *et al.*, 2014).

A questão étnica, faz parte dos determinantes sociais de saúde (DSS). Segundo alguns autores a distribuição populacional da República da Guiné-Bissau e as suas práticas culturais podem influenciar o aparecimento de doenças (Honge *et al.*, 2016). Neste estudo, observou-se que três etnias (Fula, Balanta e Mandinga) reúnem a maior percentagem de população, e isto é de uma forma proporcional refletido na estrutura demografia étnica da República da Guiné-Bissau com 28,5%, 22,5% e 14,7%, respetivamente (GUINÉ-BISSAU--RGPH/2009). Outro facto interessante é que em Bissau no caso da população VIH-positiva, a mutilação genital feminina foi responsável pela disseminação de VIH e os responsáveis dessas práticas são das etnias Fula e Mandinga que são as maioritárias neste país (Honge *et al.*, 2016). Ainda no mesmo estudo foi afirmado que um doente VIH-positivo pertencente às etnias Fula ou Mandiga tem maior probabilidade de adquirir doenças oportunistas (denominadas de avançadas) (Honge *et al.*, 2016).

Ao contrário do esperado, verificou-se no presente estudo uma maior frequência de *P. jirovecii* nas amostras de expectoração espontânea analisadas, quer de doentes com

profilaxia anti- *P. jirovecii*, quer em doentes com TARV instituídas. Embora esta análise, não tenha sido corroborada estatisticamente, os dados obtidos podem ser importantes, podendo indiciar que por algum (s) motivo(s) estas terapêuticas não estão a ser eficazes e é necessário a avaliação deste facto pelas autoridades competentes. Relativamente à profilaxia da PPC, esta é instituída aos doentes VIH-positivos na República da Guiné-Bissau segundo o padrão internacional descrito, mas o critério de recomendação para iniciação da profilaxia, não é tido em consideração devido à falta de condições nos laboratórios dos hospitais para a quantificação dos linfócitos TCD4⁺ no sangue periférico dos doentes com suspeita de infeções oportunistas e à falta, também, de meios efectivos de diagnóstico laboratorial definitivo da PPC nos doentes com suspeita clínica desta pneumonia intersticial (Jespersen, *et al.*, 2020; Matos *et al.*, 2021).

4.1 Limitações do estudo

Em fase de conclusão desta investigação, pretendemos delinear algumas limitações encontradas ao longo do estudo, assim como, fazer algumas recomendações e sugestões para a estruturação e desenvolvimento de futura investigação nesta população e país.

Quanto à amostragem, não se conseguiu obter o tamanho previsto de amostras/doentes com as características pretendidas, em parte porque o seu recrutamento foi feito em três meses e necessitávamos de mais tempo disponível. Como este trabalho foi efetuado para uma tese de mestrado o autor estava muito limitado no tempo para poder cumprir os prazos legais de entrega da tese.

A utilização da oximetria de pulso era a única técnica de medição do PaO₂ existente nos hospitais que entraram no estudo, na altura em que este trabalho foi desenvolvido no terreno, não sendo possível fazer a medição da saturação de O₂ no sangue arterial por gasometria arterial que é mais sensível, principalmente, no caso de doentes com saturações baixas de O₂ arterial (Rauniyar *et al.*, 2020).

Outras limitações deste estudo são a ausência de medição da Lactato desidrogenase (LDH), e da contagem de linfócitos TCD4⁺, técnicas que não estavam disponíveis no país devido a falta dos reagentes nos hospitais, todos sendo elementos essenciais para um diagnóstico presuntivo. Além disso, quer o LDH quer os TCD4⁺ podem ser utilizados como elementos de prognóstico da evolução da doença. (Matos *et al.*, 2017; Matos 2021).

Ainda, é importante fazer um exame físico mais detalhado dos doentes com sintomatologia pulmonar (Matos 2021).

Em estudos futuros na República da Guiné-Bissau, é necessário ter em conta a melhoria destes pontos relacionados com a informação clínica e o diagnóstico laboratorial inespecífico para se chegar a conclusões mais claras e detalhadas nesta população tão vulnerável de VIH-positivos com sintomatologia pulmonar. Ressalta-se que a infeção por *P. jirovecii* (assintomática) e a PPC (infeção sintomática/doença) podem ter grande importância em termos de saúde pública.

4.2 Conclusões

Este estudo demonstra que a presença de *P. jirovecii* nos pulmões de indivíduos VIH-positivos com suspeita ou confirmação de tuberculose pulmonar é uma realidade na República da Guiné-Bissau. Este estudo foi o primeiro a documentar a sua existência. A prevalência de infeção por *P. jirovecii* foi estimada em 26,2% na população referida. A PPC, ou seja, a doença ou infeção sintomática por *P. jirovecii* não foi possível confirmar neste estudo, devido à falta de alguns dados laboratoriais que podem ser importantes para auxiliar o raciocínio médico, como a contagem de linfócitos TCD4⁺, determinação do LDH, evolução da doença e da terapêutica. Embora todos os 61 doentes se queixassem de tosse e alguns se queixassem de falta de ar, os dados da oximetria de pulso, não ajudaram na clarificação clínica, uma vez que todos os doentes infetados por *P. jirovecii* tinham PaO₂ elevados. Estes resultados elevados de saturação de O₂ no sangue podem ser devidos a estarmos perante doentes que ainda não têm um sistema imunitário muito deteriorado, com contagem de linfócitos TCD4⁺ >200/mm³, em que há a possibilidade de adquirir TB, mas não a PPC. No entanto, esta hipótese não pode ser confirmada por, neste estudo, não haver dados sobre a contagem dos linfócitos TCD4⁺ (teste que não se fazia na altura do estudo, nos hospitais da República da Guiné-Bissau de onde provêm os doentes). Esta falta de dados clínico-laboratoriais claros não permitiu chegar à conclusão se estávamos perante casos de PPC ou de colonização por *P. jirovecii*. Com os dados obtidos podemos dizer apenas que há, pelo menos, casos de infeção, aparentemente assintomática, por *P. jirovecii*. A colonização por *P. jirovecii* caracteriza-se pela deteção de DNA do agente patogénico através de técnicas moleculares, sem sintomatologia, o que indica a presença de uma baixa carga de *P. jirovecii* nos pulmões destes doentes.

A confirmação de, pelo menos, casos de colonização por *P. jirovecii* em doentes VIH-positivos deve merecer a atenção e preocupação das Autoridades de Saúde da República da Guiné-Bissau tendo em conta o risco de transmissão, por via aérea, de *Pneumocystis* para a comunidade, tendo em consideração os doentes em fase de sida, que podem facilmente desenvolver PPC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaron, L., Saadoun, D., Calatroni, I., Launay, O., Mémain, N., Vincent, V., Marchal, G., Dupont, B., Bouchaud, O., Valeyre, D., & Lortholary, O. (2004). Tuberculosis in HIV-infected patients : a comprehensive review. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(5), 388–398. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00758>

Aderaye, G., Woldeamanuel, Y., Asrat, D., Lebbad, M., Beser, J., Worku, A., Fernandez, V., & Lindquist, L. (2008). Evaluation of Toluidine Blue O staining for the diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* in expectorated sputum sample and bronchoalveolar lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. *Infection*, 36(3), 237–243. <https://doi.org/10.1007/s15010-007-7191-8>

Arcenas, R. C., Uhl, J. R., Buckwalter, S. P., Limper, A. H., Crino, D., Roberts, G. D., & Wengenack, N. L. (2006). A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 54(3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.08.006>

Atzori, C., Bruno, A., Chichino, G., Gatti, S., & Scaglia, M. (1993). *Pneumocystis carinii* pneumonia and tuberculosis in Tanzanian patients infected with HIV. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(1), 55–56. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90418-p](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90418-p)

Bigby, T. D., Margolskee, D., Curtis, J. L., Michael, P. F., Sheppard, D., Hadley, W. K., & Hopewell, P. C. (1986). The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The American review of respiratory disease*, 133(4), 515–518. <https://doi.org/10.1164/arrd.1986.133.4>.

Baughman, R. P., Strohofer, S. S., Clinton, B. A., Nickol, A. D., & Frame, P. T. (1989). The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 113(9), 1062–1065.

Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3(4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>

Bava, A. J., Cattaneo, S., & Bellegarde, E. (2002). Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(5), 279–282. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652002000500009>.

Bishop, L. R., & Kovacs, J. A. (2003). Quantitation of anti-*Pneumocystis jiroveci* antibodies in healthy persons and immunocompromised patients. *The Journal of infectious diseases*, 187(12), 1844–1848. <https://doi.org/10.1086/375354>.

Calderón-Sandubete, E. J., Varela-Aguilar, J. M., Medrano-Ortega, F. J., Nieto-Guerrero, V., Respaldiza-Salas, N., de la Horra-Padilla, C., & Dei-Cas, E. (2002). Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist*, 153(3), 303–310. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00107>

Calderón, E. J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I., & Dei-Cas, E. (2010). *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(6), 683–701. <https://doi.org/10.1586/eri.10> .

Daly, K., Koch, J., Respaldiza, N., de la Horra, C., Montes-Cano, M. A., Medrano, F. J., Varela, J. M., Calderon, E. J., & Walzer, P. D. (2009). Geographical variation in serological responses to recombinant *P. Jirovecii* major surface glycoprotein antigens.

Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15(10), 937–942. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02716.x>

Daly, K. R., Huang, L., Morris, A., Koch, J., Crothers, K., Levin, L., Eiser, S., Satwah, S., Zucchi, P., & Walzer, P. D. (2006). Antibody response to *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein. *Emerging infectious diseases*, 12(8), 1231–1237. <https://doi.org/10.3201/eid1708.060230>

Daly, K. R., Fichtenbaum, C. J., Tanaka, R., Linke, M. J., O'Bert, R., Thullen, T. D., Hui, M. S., Smulian, A. G., & Walzer, P. D. (2002). Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jiroveci* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. *The Journal of infectious diseases*, 186(5), 644–651. <https://doi.org/10.1086/341565>

Daly, K. R., Koch, J., Levin, L., & Walzer, P. D. (2004). Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jiroveci*. *Emerging infectious diseases*, 10(5), 848–854. <https://doi.org/10.3201/eid1005.030497>

Daniel, V. S., & Daniel, T. M. (1999). Old Testament biblical references to tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(6), 1557–1558. <https://doi.org/10.1086/313562>

Daniel T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory medicine*, 100(11), 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>

Denarp, Documento de Estratégia Nacional de Redução da Pobreza. Versão corrigida em outubro de 2005 na base do Denarp adoptado em agosto de. Disponível em: <https://docplayer.com.br/8245720-Guine-bissau-documento-de-estrategia-nacional-de-reducao-da-pobreza-denarp.html>. Acedido em 30/11/2022.

Deutsche welle (2021). HIV/sida fora de controle na Guiné-Bissau Disponível em:<https://www.dw.com/pt-002/guin%C3%A9-bissau-hiv-sidest%C3%A1-fora-do-controlo-dizem-autoridades> 2021. Acedido em 28/02/2023

de Souza, W., & Benchimol, M. (2005). Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8), 903–908. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000800013>

Dieng, Y., Dieng, T., Sow, D., Wlouthou, S., Sylla, K., Tine, R., Ndiaye, M., Ndiaye, J. L., Faye, B., Faye, O., & Gaye, O. (2016). Diagnostic biologique de la pneumonie à *Pneumocystis* au centre hospitalier universitaire de Fann, Dakar, Sénégal [*Pneumocystis pneumonia biological diagnosis at Fann Teaching Hospital in Dakar, Senegal*]. *Journal de mycologie medicale*, 26(1), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.12.001>

Djata, A. (2020) Estudo de Avaliabilidade do Processo da Implementação do Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário da Guiné-Bissau de 2018-2022 enquanto estratégia da Política Nacional de Saúde; dissertação de mestrado em saúde pública e desenvolvimento- instituto de Higiene e medicina tropical, da universidade Nova de Lisboa. Lisboa, p 21-23.

Esteves, F., Antunes, F., Matos, O. (2014) *Pneumocystis* e pneumocistose: o agente patogénico e a doença (10 5 anos de investigação). RPD; 10:16-22.

Federation atlantique des agences de presse africaines (FAAPA) (2019). Saúde pública detetados 2442 casos de tuberculose na Guiné-Bissau em 2019 diz o coordenador de programa de luta contra doença Disponível: <http://www.faapa.info/blog/saude-publicadetectedados-2-422-casos-de-tuberculose-na-guine-bissau-em-2019-diz-o-coordenador-de-programa-nacional-de-luta-cont> Acesso em: 12/02/2023.

Fronteira, I., Ferrinho, F., Dussaul, T.G., Ferrinho, P. (2007). Relatório de Avaliação Final da Execução do Plano Nacional de Desenvolvimento Sanitário 2003-2007 da República da Guiné-Bissau. AGO, Lisboa

Gradmann, C. (2006). Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes and infection*, 8(1), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.004>.

Guerreiro, C.S., Hartz, Z., Ferrinho, P., Havik, P.J. (2019). 25 Anos de Política Nacional de Saúde na República da Guiné-Bissau: Memórias do seu Planeamento Estratégico em Saúde. *Cadernos de Estudos Africanos*; 38. DOI: 10.4000/cea.4619

Guiné-Bissau (2009). Censo, Recenseamento geral da população e habitação Guiné-Bissau: III RGPH/2009 Disponível em <http://arks.princeton.edu/ark:/88435/dsp01w6634600z>

Hartung, T. K., Chimbayo, D., van Oosterhout, J. J., Chikaonda, T., van Doornum, G. J., Claas, E. C., Melchers, W. J., Molyneux, M. E., & Zijlstra, E. E. (2011). Etiology of suspected pneumonia in adults admitted to a high-dependency unit in Blantyre, Malawi. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(1), 105–112. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0640>.

Hønge, B. L., Jespersen, S., Aunsborg, J., Mendes, D. V., Medina, C., da Silva Té, D., Laursen, A. L., Erikstrup, C., Wejse, C., & Bissau HIV cohort study group (2016). High prevalence and excess mortality of late presenters among HIV-1, HIV-2 and HIV-1/2 dually infected patients in Guinea-Bissau - a cohort study from West Africa. *The Pan African medical journal*, 25, 40. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.25.40.8329>

Huggett, J. F., Taylor, M. S., Kocjan, G., Evans, H. E., Morris-Jones, S., Gant, V., Novak, T., Costello, A. M., Zumla, A., & Miller, R. F. (2008). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*, 63(2), 154–159. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.081687>

Instituto nacional de saúde pública (INASA). Relatório Tuberculose 1º Semestre 2017.

Instituto nacional de estatística (INE) (2018-2019). Inquérito aos Indicadores Múltiplos (MICS6) Relatório Final. Bissau, Ministério da Economia e Finanças e Direção Geral do Plano, 2020. Disponível em: https://statguineebissau.com/Menu_principal/Publica%C3%A7%C3%B5es/MICS/G-B_MICS6_Statistical_Snapshot.pdf. Acedido em 16/03/2023

Instituto nacional de estatística (INE). Recenseamento geral da população 1991, disponível em: https://statguineebissau.com/Menu_principal/IV_RGPH/rgph1/Ficheiro_locl_1991.pdf

Instituto de pesquisa económica aplicada (IPEA) (2014). objetivo de desenvolvimento de milênio: Relatório nacional, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea) Brasília, cap-6, pp 88-97.

Jespersen, S., Månsson, F., Lindman, J., Wejse, C., Medina, C., da Silva, Z. J., Te, D., Medstrand, P., Esbjörnsson, J., & Hønge, B. L. (2020). HIV treatment in Guinea-Bissau: room for improvement and time for new treatment options. *AIDS research and therapy*, 17(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12981-020-0259-6>

Jespersen, S., Hønge, B. L., Krarup, H., Medstrand, P., Sørensen, A., Medina, C., Té, D. D. S., Correia, F. G., Erikstrup, C., Østergaard, L., Wejse, C., Laursen, A. L., &

Bissau HIV Cohort study group (2018). Protease Inhibitors or NNRTIs as First-Line HIV-1 Treatment in West Africa (PIONA): A Randomized Controlled Trial. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999), 79(3), 386–393. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001820>

Jespersen, S., Hønge, B. L., Oliveira, I., Medina, C., da Silva Té, D., Correia, F. G., Erikstrup, C., Laursen, A. L., Østergaard, L., Wejse, C., & Bissau HIV Cohort study group (2015). Cohort Profile: The Bissau HIV Cohort-a cohort of HIV-1, HIV-2 and co-infected patients. *International journal of epidemiology*, 44(3), 756–763. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu201>

Jordao, L., Vieira, O. V. (2011). Tuberculosis: new aspects of an old disease. *International journal of cell biology*, 2011, 403623. <https://doi.org/10.1155/2011/403623>

Kühle, A. J., Patsche, C. B., Fløe, A., Sifna, A., Gomes, V., Wejse, C., Rudolf, F. (2022). TB-related deaths among adults in Guinea-Bissau. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 26(7), 664–670. <https://doi.org/10.5588/ijtld.21.0483>

Lautenschlager, I., Lyytikäinen, O., Jokipii, L., Jokipii, A., Maiche, A., Ruutu, T., Tukiainen, P., Ruutu, P. (1996). Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *Journal of clinical microbiology*, 34(3), 728–730. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.3.728-730.1996>

Lima, H.M.M. (2017). Diagnóstico situacional sobre implementação de recomendação de opção B+, de transmissão vertical de VIH, Sífilis congênita, no âmbito de

comunidade de países da língua oficial portuguesa-CPLP. Disponível em: https://saude.cplp.org/media/iwddidapp/cplp_portugal_2018.pdf.

Maartens, G. (2002). Opportunistic infections associated with HIV infection in Africa. *Oral diseases*, 8 Suppl 2, 76–79. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.00016.x>

Malin, A. S., Gwanzura, L. K., Klein, S., Robertson, V. J., Musvaire, P., & Mason, P. R. (1995). *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Zimbábue. *Lancet*, 346(8985), 1258–1261. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)91862-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)91862-0)

Manjuba, C. (2007). Vigilância epidemiológica da tuberculose na República da Guiné-Bissau. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. Doi: 10.11606/D.6.2007.tde-01062007-131301. Recuperado em 2022-01-12, de www.teses.usp.br

Martinez, A., Aliouat, elM., Standaert-Vitse, A., Werkmeister, E., Pottier, M., Pinçon, C., Dei-Cas, E., & Aliouat-Denis, C. M. (2011). Ploidy of cell-sorted trophic and cystic forms of *Pneumocystis carinii*. *PloS one*, 6(6), e20935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020935>

Matos, O. (2021). Pneumocistose e toxoplasmose. In: Manual sobre Sida, 6ª edição. Francisco Antunes & Fernando Maltez (Editor). Permanyer Portugal, V Secção, Cap. 3.2, pp. 89-97.

Matos, O. (2018). Pneumocistose e toxoplasmose. In: Manual sobre Sida, 5ª edição. Francisco Antunes & Fernando Maltez (Editor). Permanyer Portugal, V Secção, Cap. 4.2, pp. 103-108.

Matos, O., Tomás, A.L., Antunes, F. (2017). *Pneumocystis jirovecii* and Pneumocystosis. In: Current Progress in Medical Mycology. Montes H. M. M & Lopes-Bezerra L. M. (eds.). Springer; 7:215-54.

Matos, O. (2012). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Africa: impact and implications of highly sensitive diagnostic technologies. North American Journal of Medical Sciences; 4:486-7.

Matos, O., Costa, M. C., Correia, I., Monteiro, P., Vieira, J. R., Soares, J., Bonnet, M., Esteves, F., & Antunes, F. (2006). Infecção por *Pneumocystis jirovecii* em imunocompetentes com patologia pulmonar, em Portugal [Pneumocystis jirovecii infection in immunocompetent patients with pulmonary disorders, in Portugal]. *Acta medica portuguesa*, 19(2), 121–126.

Matos, O., Lundgren, B., Caldeira, L., Mansinho, K., Aguiar, P., Forte, M., & Antunes, F. (1999). Evaluation of a nested PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in serum from immunocompromised patients. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(5), 104S–105S.

Mitchison, D., & Davies, G. (2012). The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 16(6), 724–732. <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0083>

Morris, A., Lundgren, J. D., Masur, H., Walzer, P. D., Hanson, D. L., Frederick, T., Huang, L., Beard, C. B., & Kaplan, J. E. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerging infectious diseases*, 10(10), 1713–1720. <https://doi.org/10.3201/eid1010.030985>

Mothershed, E. A., & Whitney, A. M. (2006). Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical

laboratory. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 363(1-2), 206–220. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.050>

Nowaseb, V., Gaeb, E., Fraczek, M. G., Richardson, M. D., & Denning, D. W. (2014). Frequency of *Pneumocystis jirovecii* in sputum from HIV and TB patients in Namibia. *Journal of infection in developing countries*, 8(3), 349–357. <https://doi.org/10.3855/jidc.3864>

Orlovic, D., Kularatne, R., Ferraz, V., & Smego, R. A., Jr (2001). Dual pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis carinii* in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(2), 289–294. <https://doi.org/10.1086/318475>

PNDSII, Plano Nacional de desenvolvimento Sanitário 2018-2022; 61-62 Disponível em: <https://extranet.who.int/mindbank/item/3640> Acedido: 15/07/2022

Redhead, S. A., Cushion, M. T., Frenkel, J. K., & Stringer, J. R. (2006). *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 53(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00072.x>.

Riebold, D., Enoh, D. O., Kinge, T. N., Akam, W., Bumah, M. K., Russow, K., Klammt, S., Loebermann, M., Fritzsche, C., Eyong, J. E., Eppel, G., Kundt, G., Hemmer, C. J., & Reisinger, E. C. (2014). *Pneumocystis jirovecii* colonisation in HIV-positive and HIV-negative subjects in Cameroon. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 19(6), 643–655. <https://doi.org/10.1111/tmi.12299R>

Rauniyar, N., Pujari, S., & Shrestha, P. (2020). Study of Oxygen Saturation by Pulse Oximetry and Arterial Blood Gas in ICU Patients: A Descriptive Cross-sectional

Study. *JNMA; journal of the Nepal Medical Association*, 58(230), 789–793.
<https://doi.org/10.31729/jnma.5536>

Ruggli, G. M., Weber, R., Messmer, E. P., Font, R. L., Moll, C., & Bernauer, W. (1997). *Pneumocystis carinii* infection of the conjunctiva in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology*, 104(11), 1853–1856.
[https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(97\)30017-7](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(97)30017-7).

Sheikholeslami, M. F., Sadraei, J., Farnia, P., Forozandeh Moghadam, M., & Emadi Kochak, H. (2015). Co-infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis jirovecii* in the Iranian Patients With Human Immunodeficiency Virus. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2), e17254. <https://doi.org/10.5812/jjm.17254>

Smulian, A. G., Theus, S. A., Denko, N., Walzer, P. D., & Stringer, J. R. (1993). A 55 kDa antigen of *Pneumocystis carinii*: analysis of the cellular immune response and characterization of the gene. *Molecular microbiology*, 7(5), 745–753.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01165.x>

Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F., & Wakefield, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 891–896. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020096>

Taylor, S. M., Meshnick, S. R., Worodria, W., Andama, A., Cattamanchi, A., Davis, J. L., Yoo, S. D., Byanyima, P., Kaswabuli, S., Goodman, C. D., Huang, L., & International HIV-associated Opportunistic Pneumonias Study (2012). Low prevalence of *Pneumocystis pneumonia* (PPC) but high prevalence of pneumocystis dihydropteroate synthase (dhps) gene mutations in HIV-infected persons in Uganda. *PloS one*, 7(11), e49991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049991>

Tamburrini, E., Mencarini, P., Visconti, E., Zolfo, M., De Luca, A., Siracusano, A., Ortona, E., & Wakefield, A. E. (1996). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *Journal of clinical microbiology*, 34(6), 1586–1588. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.6.1586-1588.1996>

Thomas, C. F., Jr, & Limper, A. H. (2004). *Pneumocystis* pneumonia. *The New England journal of medicine*, 350(24), 2487–2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032588>.

UNAIDS. 90–90–90. (2017) an ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic disponível em: www.unaids.org/en/resources/documents/2017/90-90-90 Acedido: 15/4/2022.

UNAIDS (2021), epidemiological estimates. disponível em: <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/guinea-bissau> Acedido: 20/8/2022

Yoneda, K., & Walzer, P. D. (1983). Attachment of *Pneumocystis carinii* to type I alveolar cells studied by freeze-fracture electron microscopy. *Infection and immunity*, 40(2), 812–815. <https://doi.org/10.1128/iai.40.2.812-815.1983>

Ypma-Wong, M. F., Fonzi, W. A., & Sypherd, P. S. (1992). Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infection and immunity*, 60(10), 4140–4145. <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.4140-4145.1992>

Wakefield, A. E., Pixley, F. J., Banerji, S., Sinclair, K., Miller, R. F., Moxon, E. R., & Hopkin, J. M. (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*, 336(8713), 451–453. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92008-6](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92008-6)

Wasserman, S., Engel, M. E., Griesel, R., & Mendelson, M. (2016). Burden of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected adults in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*, 16(1), 482. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1809-3>

6. ANEXOS

6.1 Anexo nº 01 – Consentimento informado

Infeção por *Pneumocystis jirovecii* em doentes seropositivos para VIH e suspeita de tuberculose pulmonar na Guiné-Bissau.

CONSENTIMENTO INFORMADO

Pneumocystis é um microrganismo causador de pneumonia (PPC ou pneumocistose) em doentes imunocomprometidos. Na Guiné-Bissau não existem dados sobre esta infeção oportunista que provoca grande morbilidade e mortalidade e que é emergente em países em desenvolvimento.

Será recolhida expectoração espontânea. A colheita só será feita no contexto da recolha de amostras para outros exames necessários no âmbito dos cuidados médicos habituais a prestar aos doentes.

O doente participante não terá nenhuma vantagem especial por participar neste estudo. Será beneficiário dos resultados dos testes que serão feitos e também de um melhor tratamento. O diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis* vai levar a um tratamento mais eficaz do quadro clínico do doente, e este estudo irá ajudar no desenvolvimento de estratégias para controlar melhor esta doença oportunistas na Guiné-Bissau.

Os riscos de participação são mínimos, porque não se trata de um estudo interventivo. O pessoal envolvido no estudo está treinado para recolher as amostras de expectoração e as informações sobre a doença com respeito e sensibilidade.

Em qualquer altura do estudo o doente pode desistir de participar.

MÉDICO :

Confirmo que expliquei ao doente •, de forma adequada e inteligível, os diagnósticos, as intervenções ou os tratamentos referidos, o tipo de anestesia no caso de ser proposta, assim como os riscos e complicações, e as alternativas possíveis à situação clínica.

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Nome do médico: _____

DOENTE :

Eu, _____
autorizo que o material colhido (expectoração) seja utilizado para um estudo da infeção por *Pneumocystis jirovecii*.

Todos os meus dados pessoais manter-se-ão dentro da mais estrita confidencialidade.

Assinatura: _____

Data: __/__/__

6.2 Anexo nº 02 - Questionário

Infeção por *Pneumocystis jirovecii* em doentes seropositivos para VIH e suspeita de tuberculose pulmonar na Guiné-Bissau

Número:

Data: __/__/__

Nome (iniciais):	Sexo: M ☐ F ☐	
Data de nascimento: __/__/__	Raça:	
	Etnia:	
Nº Processo ou NID:	Serviço:	Hospital:

Infecção por *Mycobacterium tuberculosis*:

Isolamento: Sim _____

Data: __/__/__

Suspeita de infecção por *M. tuberculosis*:

Colheita: Sim _____

Data: __/__/__

Outras infecções:

Padrão de Rx. de tórax:

Terapêutica anti-bacilar:

Fármaco

- ☐ Isoniazida (INH)
- ☐ Rifampicina (RIF)
- ☐ Pirazinamida (PZA)
- ☐ Etambutol (EMB)
- ☐ Outro

Dose:

Duração:

Infeção por *Pneumocystis jirovecii* em doentes seropositivos para VIH e suspeita de tuberculose pulmonar na Guiné-Bissau

Episódios anteriores de PPc: Não ☐
Sim ☐

Data: __/__/__

Profilaxia anti-PPc:

Fármaco

Posologia

Duração

Terapêutica anti-PPc:

Fármaco

Posologia

Duração

T CD4+: _____ LDH: _____ PaO₂: _____

Rx Tórax:

Padrões:

- ☐ Normal
- ☐ Intersticial difuso
- ☐ Micronodular
- ☐ Lesões cavitárias
- ☐ Abscessos
- ☐ Pneumotórax
- ☐ Derrame pleural

VIH+: Sim ☐

Não ☐

Data de diagnóstico: _____

Comportamento de risco:

Terapêutica antirretroviral: Sim _____

Data: __/__/__

Não _____

Diagnóstico de saída:

6.3 Anexo nº 03 – Quadro comparativo entre a presença de *P. jirovecii* na população analisada no presente trabalho e em outros estudos desenvolvidos em África.

Variáveis	Nosso Estudo	Outros estudos		Possível justificação para discrepância
Prevalência de <i>P. jirovecii</i>	26,2% (16/61) VIH+ Amostra: expetoração espontânea, Técnica: IF-AcM e/ou PCR-nested	Tanzânia: 3,6% (3/83) VIH+ (Atzori <i>et al.</i> , 1993) Senegal, 9% (16/183) VIH+ e VIH-doentes com PPC (Dieng <i>et al.</i> , 2016), Uganda: 3,9% (5/129) VIH+ (Taylor <i>et al.</i> , 2011) Namíbia: 5,3% (25/475) VIH+ e VIH- (Nowaseb <i>et al.</i> , 2014)	Tipo de amostra: Expetoração induzida Técnica: Microscopia direta por coloração Dif Quik e TBO Tipo de amostra: LBA Técnica: IFI-AcM. Tipo de amostra: LBA. Técnica: Microscopia direta por Coloração de Dif Quik Amostra: Expetoração espontânea Técnica: PCR quantitativo e/ou GMS	- Técnicas de coloração histoquímica - Técnicas de diagnóstico - População em estudo - Técnicas de diagnóstico - Tamanho da amostra - População em estudo

Variáveis	Nosso Estudo	Outros estudos		Possível justificação para discrepância
Prevalência de <i>P. jirovecii</i>	26,2% (16/61) VIH+ Amostra: expetoração espontânea, Técnica: IF-AcM e/ou PCR-nested	Malawi: 27% (14/51) 94% pop VIH+ (Hartung <i>et al.</i> , 2011) Camarões: 31, 6% (75/237) (42,9% VIH+ vs 18,9% VIH-) População > VIH+ (Riebolt <i>et al.</i> , 2014)	Amostra: LBA Técnica: IFI-AcM e PCR em Tempo Real Amostra; Expetoração induzida Técnica: PCR-nested Amostra: LBA	Produtos biológicos com maiores cargas parasitárias (LBA e expetoração induzida)

		Zimbabwe: 33% (21/64) em doentes VIH+ com pneumonia aguda difusa (Malin <i>et al.</i> , 1995)	Técnica: Microscopia direta com coloração de GMS, TBO e DIF-QUIK. (Embora só 6 doentes confirmados por PCR).	
Variáveis	Nosso Estudo	Outros estudos		Possível justificação para discrepância
Coinfecção <i>P. jirovecii</i> /TB	18% (11/61) Genex Expert (Técnica molecular) Hospital especializado em diagnóstico e tratamento de TB	Tanzânia: 2,4% (2/83) (Atzori <i>et al.</i> , 1993) Zimbawe: 9,4% (6/64) (Malin <i>et al.</i> , 1995) Namíbia: 0,6% (3/475) (Nowaseb <i>et al.</i> , 2014)	TB: Ziehl-Neelsen e cultura TB: Baciloscopia e cultura TB: Microscopia direta por coloração pela Auramina O	• Técnica de diagnóstico TB • Subdiagnóstico de PPC