



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Utilidade clínica do (1→3)- β -D-glucano como marcador
laboratorial no diagnóstico de Pneumonia por
Pneumocystis jirovecii

Maria Margarida Moreira Seringa

Lisboa, 2012

Dissertação de candidatura ao grau de
Mestre em Parasitologia Médica
Pela Universidade Nova de Lisboa,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Orientadora: Professora Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos
Co-Orientador: Investigador Doutor Francisco Esteves
Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozoonoses
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

À memória do meu avô António

Agradecimentos

À Professora Doutora Olga Matos, orientadora do presente trabalho, agradeço a orientação, os conselhos e a disponibilidade.

Ao Eng^o Francisco Esteves, pelo valioso ensinamento. O meu agradecimento pela paciência, ajuda e apoio.

A todos os meus amigos em particular, Teresa Ramos, Filipe Borges, Ana Maria Barreira e Ana Sofia Nobre por nunca terem deixado de acreditar em mim e não me deixarem desistir.

À minha amiga Ângela Duarte por estar sempre presente nos bons e nos maus momentos.

Ao João Santos por toda a ajuda que me deu durante a realização deste trabalho.

À minha família principalmente aos meus pais pelo apoio incondicional.

Resumo

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc) é uma das principais causas de morte em doentes imunocomprometidos, revestindo-se assim de elevado interesse o diagnóstico precoce desta infecção, por forma a instaurar a terapêutica adequada. Actualmente, os meios laboratoriais de diagnóstico baseiam-se fundamentalmente na detecção directa deste microrganismo nas secreções pulmonares dos doentes, o que implica a realização de procedimentos invasivos. É nessa perspectiva que surge o doseamento do β -glucano no soro de doentes com presumível infecção, uma vez que, este composto é um dos principais componentes da parede dos quistos de *P. jirovecii*.

Neste estudo procedeu-se ao doseamento do β -glucano em amostras de soro de 66 indivíduos e verificou-se que, nos 47 indivíduos que confirmaram o diagnóstico de PPc, a mediana de β -glucano obtida foi de 314,5 pg/mL, enquanto nos restantes 19 foi de 63,7 pg/mL. Estatisticamente obteve-se uma forte correlação entre níveis elevados de β -glucano no soro de doentes e a presença de infecção por *P. jirovecii*. Em relação ao diagnóstico clínico, os resultados obtidos demonstraram correlação entre um diagnóstico clínico sugestivo de PPc e níveis elevados de β -glucano no soro. Constatou-se ainda que, para a infecção por *P. jirovecii* o cut-off que apresentou melhores resultados para o teste Fungitell[®] situa-se nos 100 pg/mL, obtiveram-se resultados de sensibilidade de 89% e especificidade de 74%.

Estudos preliminares apontaram para o facto de níveis elevados de β -glucano no soro corresponderem a níveis elevados de parasitémia e uma evolução clínica negativa da doença.

Palavras-chave Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*; β -glucano; diagnóstico não-invasivo

Abstrat

Pneumocystis jirovecii pneumonia (PcP) is a leading cause of death in immunocompromised patients, covering thus of great interest for early diagnosis of this infection, in order to provide appropriate therapy. Currently, diagnostic laboratory are mainly based on direct detection of this microorganism in the pulmonary secretions of patients, which involves invasive procedures. In this perspective, there is the determination of β -glucan in the serum of patients with suspected infection, since this compound is a major component of the cyst wall of *P. jirovecii*.

In this study proceeded to the determination of β -glucan in serum samples from 66 individuals and found that in 47 individuals who confirmed the diagnosis of PCP, the median β -glucan obtained was 314.5 pg / mL, while the remaining 19 was 63.7 pg / mL. Statistically it was found a strong correlation between high levels of β -glucan in the serum and the presence of infection by *P. jirovecii*. In relation to clinical diagnosis, the results showed a correlation between clinical diagnosis suggestive of PcP and high levels of β -glucan in the serum. It was further observed that for infection with *P. jirovecii* the cut-off showed better results for the test Fungitell ® is located at 100 pg / mL with the results of sensitivity of 89% and specificity of 74%.

Preliminary studies pointed to the fact that high levels of β -glucan in serum correspond to high levels of parasitemia and a negative clinical course of disease.

Keywords *Pneumocystis jirovecii* pneumonia; β -glucan; non-invasive diagnosis

Índice Geral

Lista de abreviaturas e siglas	ix
Índice de figuras	xi
Índice de quadros	xii
1. Introdução	1
1.1 Referência histórica e classificação taxonómica	1
1.2 Caracterização de <i>Pneumocystis</i>	3
1.2.1 Transmissão	3
1.2.2 Ciclo de vida	4
1.2.3 Morfologia	5
1.3 Resposta do sistema imunitário	8
1.4 Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> (PPc)	11
1.4.1 Epidemiologia	11
1.4.2 PPc e VIH/Sida	12
1.4.3 Sintomas	13
1.4.4 Diagnóstico Presuntivo	14
1.4.5 Diagnóstico Definitivo	15
1.4.6 Tratamento e Profilaxia	20
1.5 Objectivo	21
2. Materiais e Métodos	22
2.1 Caracterização da amostra	22
2.2 Metodologia	22
2.2.1 Processamento de produtos biológicos	24
2.2.2 Diagnóstico parasitológico de <i>P. jirovecii</i>	26
2.2.3 Diagnóstico molecular de <i>P. jirovecii</i>	27
2.2.4 Detecção do (1→3)-β-D-glucano	31
2.2.3 Processamento da informação clínica	35
2.2.6 Análise de dados	36

3. Resultados	37
<hr/>	
4. Discussões dos resultados e Conclusões	47
<hr/>	
5. Referências bibliográficas	51
<hr/>	

Lista de abreviaturas e siglas

AcM - Anticorpo monoclonal

AUC – Área abaixo da curva de ROC

BSA – Albumina sérica bovina

BTB – Biópsia transbrônquica

CDC – Centro de Controlo de Doenças

DNA – Ácido desoxiribonucleico

dNTP – Desoxinucleótidos trifosfato

DTT - Ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EI – Expectoração induzida

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

HAART – Terapêutica antiretroviral potente

IF – Imunofluorescência

IFI – Imunofluorescência indirecta

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INF- γ – Interferão gama

LAL – Lisado modificado do amebócito *Limulus*

LBA – Lavado Broncoalveolar

LDH – Lactato desidrogenase

LO – Lavado oral

MSG – Glicoproteína *major* de superfície

mtLSUrRNA – Subunidade grande do RNA ribossómico mitocondrial

PaO₂ – Pressão parcial de oxigénio arterial

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

PPc – Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

RGW – *Reagente grade water*

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

SPPS – *Statistical package for the social sciences*

ROC – Característica de operação do receptor

SCID – Imunodeficiência severa combinada

Sida – Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

SMF – Sulfametoxazol

TAC – Tomografia axial computadorizada

TAE – Tampão tris-acetato-EDTA

TMP – Trimetoprim

TNF- α – Factor de necrose tumoral alfa

Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

(1 \rightarrow 3)- β -D-glucano – β -glucano

Índice de figuras

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i>	4
Figura 2. Representação do ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i> por microscopia electrónica com correspondente adaptação esquemática do desenvolvimento do microrganismo nos pulmões de mamíferos.....	6
Figura 3. Detecção de diferentes formas de <i>Pneumocystis</i> utilizando diferentes colorações.....	16
Figura 4. Detecção de diferentes formas de <i>Pneumocystis</i> utilizando coloração por IF com ampliação de 400x.....	17
Figura 5. Imagem da cascata metabólica do lisado de amebócitos <i>Limulus</i>	19
Figura 6. Fluxograma da metodologia aplicada no estudo.....	23
Figura 7. Representação esquemática de uma curva cinética enzimática da cascata metabólica de LAL activada pelo β -glucano.....	33
Figura 8. Representação esquemática de uma curva padrão de concentração de β -glucano em função de V máx.....	34
Figura 9. Gráfico da distribuição dos níveis de β -glucano nos indivíduos com e sem PPc.....	41
Figura 10. Gráfico da distribuição dos níveis de β -glucano nos indivíduos com e sem diagnóstico clínico sugestivo de PPc.....	42
Figura 11. Curva de ROC para a presença de PPc em função de três valores de cut-off de β -glucano.....	45
Figura 12. Curva de ROC para o diagnóstico clínico sugestivo de PPc em função de três valores de cut-off de β -glucano.....	46

Índice de quadros

Quadro 1. Diagnóstico semi-quantitativo dos quistos de <i>P. jirovecii</i> por IFI/AcM.	27
Quadro 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> por PCR “ <i>nested</i> ”.....	29
Quadro 3. Condições térmicas aplicadas na PCR “ <i>nested</i> ”, para a amplificação específica do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i>	30
Quadro 4. Esquema da placa de reacção utilizada no estudo.....	32
Quadro 5. Interpretação dos resultados do teste Fungitell [®] para a detecção de β -glucano.....	34
Quadro 6. Parâmetros clínicos, imunológicos e laboratoriais dos 66 indivíduos com suspeita de PPc, em estudo.....	38
Quadro 7. Diagnóstico de PPc, parasitémia e evolução clínica dos 66 indivíduos com suspeita de PPc, em estudo, em função dos níveis de β -glucano.....	40
Quadro 8. Medidas estatísticas calculadas para diferentes valores de cut-off.....	43

1. Introdução

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc) é uma das maiores causas de morte em doentes imunocomprometidos principalmente em portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH). Desta forma, reveste-se de grande interesse o diagnóstico precoce desta infecção, por forma a instaurar a terapêutica adequada o mais precocemente possível. Actualmente os meios laboratoriais de diagnóstico baseiam-se fundamentalmente na detecção directa de *Pneumocystis* em amostras pulmonares o que implica a realização de exames invasivos que, com frequência, colocam em risco a vida dos doentes, já por si muito debilitada. É nessa perspectiva que surge o doseamento do β -glucano no soro de doentes com presumível infecção, uma vez que, este composto é um dos principais componentes da parede dos quistos de *P. jirovecii*. O presente estudo tem como objectivo determinar a utilidade clínica do β -glucano como marcador biológico na definição de infecção por *Pneumocystis jirovecii* e, igualmente, como indicador quantitativo da infecção, útil não só no diagnóstico da primo-infecção como também na monitorização do tratamento.

1.1 Referência histórica e Classificação taxonómica de *Pneumocystis*

O Género *Pneumocystis* foi descrito pela primeira vez, em 1909 por Carlos Chagas que observou ao microscópio óptico a presença de quistos em amostras histológicas de secções de pulmões. A descrição de esquizontes como forma do ciclo intracelular do parasita da malária tinha sido realizada apenas alguns anos antes, facto que terá influenciado Carlos Chagas a considerar estes novos quistos como um esquizonte tecidular que ocorreria durante o ciclo de vida de uma nova espécie de tripanossoma designada por *Shizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909).

Só mais tarde, em 1912 quando o casal Delanoe e Delanoe observou as formas anteriormente descritas, em ratos da espécie *R. norvegicus* que não estavam infectados com *Trypanossoma* foi possível concluir, que se estava perante um novo protozoário designado de *Pneumocystis carinii*. Esta denominação está relacionada com o tropismo que a espécie tem para os pulmões “*Pneumo*”, o “*cystis*” deve-se à sua forma típica e “*carinii*” em honra ao biólogo italiano, Antonio Carini que, em 1910 descreveu o

mesmo microrganismo nos pulmões de ratos provenientes do Brasil e infectados simultaneamente com *Trypanosoma lewisi* (Chagas, 1909; Delanoe & Delanoe, 1912).

Durante muitos anos *P. carinii* foi considerado um protozoário com poucas implicações médicas relevantes e pouco estudado. No entanto, dois conjuntos de observações foram responsáveis pela inclusão de *P. carinii* como um dos microrganismos mais importantes dos últimos anos.

O primeiro conjunto de observações dizia respeito à relevância clínica deste microrganismo. Uma vez que, verificou-se o aparecimento de um enorme número de casos de pneumonia em crianças prematuras e mal nutridas na Europa Central e Ocidental durante e após a II Guerra Mundial. Nos anos 60 do século XX, *Pneumocystis* humano foi reconhecido como uma das principais causas de infecção pulmonar oportunista em crianças com imunodeficiência primária, e em doentes que utilizavam imunossupressores para o tratamento de cancro ou no transplante de órgãos (Walzer *et al.*, 1974).

A importância da infecção por *Pneumocystis jirovecii* ganhou ainda mais relevo na década de 80 do mesmo século com o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (Sida), sendo este microrganismo considerado a maior causa de infecção oportunista e de morte. Mais de 90% dos doentes com sida e células T CD₄⁺ inferiores a 200 células/mm³ desenvolviam pneumocistose (Mills, 1986).

O segundo conjunto de observações relacionou-se com estudos ultracelulares efectuados neste parasita, que não comprovaram a presença de elementos do citoesqueleto e de sistemas de organelos complexos característicos dos protozoários. Além de que, o estudo comparativo da subunidade pequena do ribossoma do *Pneumocystis carinii* (16s link rRNA) e do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrou uma evolução filogenética semelhante (Edman *et al.*, 1988).

A classificação final deste microrganismo levou décadas, no entanto, actualmente, é aceite pela comunidade científica que *Pneumocystis* é um fungo, devido à semelhança genética entre o RNA ribossomal deste género e dos fungos (Edman *et al.*, 1988).

Estudos moleculares efectuados demonstraram uma significativa diversidade genética na população natural de *Pneumocystis carinii*. *Pneumocystis* foi isolado em diferentes espécies de animais, nomeadamente no homem, no macaco, no rato, no cão e no gato o que apontou para a existência de diferentes espécies deste género (De Souza & Benchimol, 2005).

Em 1999, a comunidade científica mudou a designação da espécie isolada dos humanos para *P. jirovecii* em homenagem a Otto Jirovec, parasitologista checoslovaco, por ter sido o primeiro a identificar diferenças entre as espécies que infectam os humanos e as que infectam os outros animais. No entanto, em estudos realizados em 1976, pelo Dr Frenkel, já foi possível observar que *Pneumocystis* isolado de pulmão humano não reagia com soro hiperimune de ratos infectados com *P. carinii* (Stringer *et al.*, 2002).

A classificação taxonómica esquemática de *Pneumocystis* (Hibbett *et al.*, 2007) encontra-se resumida de seguida.

Super Reino Eukaryota

Reino Fungi

Sub-reino Dikarya

Filo Ascomycota

Sub-Filo Taphrinomycotina *sensu*

Classe Pneumocystidomycetes

Ordem Pneumocystidales

Família Pneumocystidaceae

Género *Pneumocystis*

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

1.2 Caracterização de *Pneumocystis*

1.2.1 Transmissão

Pneumocystis tem um tropismo único para o tecido pulmonar. Todos os estádios do ciclo de vida de *Pneumocystis* foram encontrados nos pulmões de mamíferos infectados e menos frequentemente em localizações extrapulmonares em hospedeiros imunocomprometidos (Ng *et al.*, 1997; Anuradha, 2007).

A transmissão parece ocorrer de indivíduo para indivíduo por via aérea (Hughes, 1982) e, a forma infectante ainda não está bem definida. Por outro lado, apesar de ter sido detectado DNA de *Pneumocystis* no ar, não foi possível isolar o microrganismo na

sua forma ambiental (Wakefield, 1996). Estudos mais recentes apontam para a transmissão transplacentar deste microrganismo, uma vez que, o DNA de *P. jirovecii* foi identificado em 35% de tecidos fetais humanos analisados por Montes-Cano *et al.*, em 2008.

A espessa parede celular do quisto maduro parece ser um factor importante para a manutenção da infecciosidade do microrganismo durante a transmissão aérea. Além disso, a detecção de quistos maduros no lúmen dos brônquios sugere a possibilidade dos quistos atingirem o exterior e serem transmitidos para um novo hospedeiro (Dei-cas, 2000).

1.2.2 Ciclo de vida

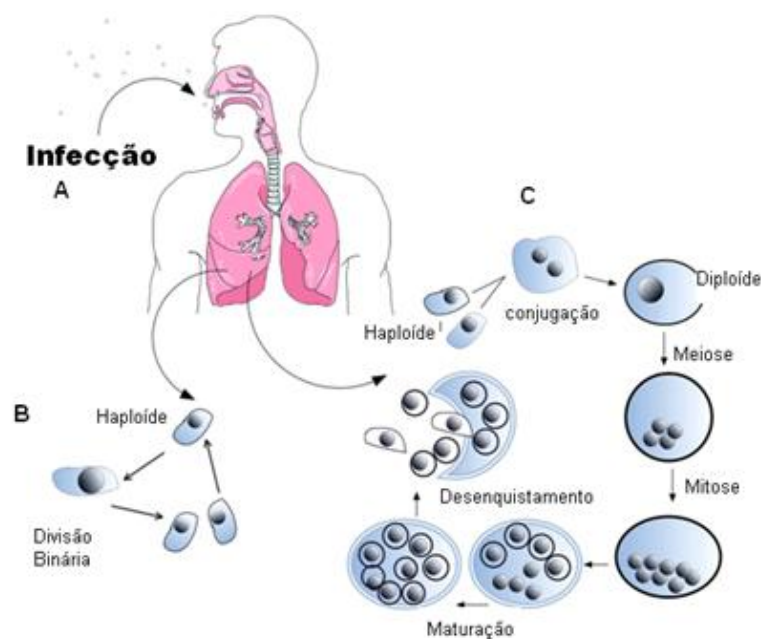


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *Pneumocystis*. (A) Infecção pulmonar. (B) Ciclo assexuado. (C) Ciclo sexuado. (Beck & Cushion, 2009)

Vários autores consideram diferentes hipóteses para o ciclo de vida de *Pneumocystis* mas todos concordam que tanto a reprodução sexual como a assexual só ocorrem *in vivo* (Dei-Cas *et al.*, 2004; De Sousa & Benchimol, 2005). Isto prende-se com o facto de não existir um sistema experimental no qual este microrganismo possa ser mantido *in vitro*, o que dificulta o estudo detalhado do seu ciclo de vida.

No entanto, verifica-se que, o trofozoíto haploíde multiplica-se, maioritariamente, por divisão binária ou endogenia mas pode também ocorrer a reprodução sexuada conjugando-se com outro trofozoíto haploíde. Neste caso, obtêm-se uma célula diplóide que se multiplica por meiose seguida de mitose originando uma célula com oito núcleos. Posteriormente, ocorre a delimitação celular formando oito esporos ou corpos intraquísticos. Cada esporo origina um novo trofozoíto (figura 1).

Recentemente, foram identificados genes de conjugação no genoma de *Pneumocystis* que provam a existência de conjugação entre os trofozoítos. Em 1996 Itatani evidenciou a presença de trofozoítos binucleados nos pulmões de ratos infectados (Itatani, 1996). O género *Pneumocystis* é uma excepção no reino dos fungos uma vez que, a maioria destes não consegue completar o ciclo sexuada em animais (Sexton & Howlett, 2006).

Estudos mais recentes apontam para o facto da divisão binária ocorrer apenas dentro dos quistos (Cushion, 2004).

1.2.3 Morfologia

Inicialmente foi possível identificar apenas duas formas morfológicas de *Pneumocystis*, uma mais pequena, designada por trofozoíto ou forma trófica, e uma de maiores dimensões, o quisto. Estudos por microscopia electrónica permitiram demonstrar ainda a presença de uma terceira forma, o pré-quisto ou esporocisto, que compreende três estádios, primário, intermediário e final (Figura 2) (Matsumoto & Yoshida, 1984; Haidaris *et al.*, 1993).

O **trofozoíto** é a forma mais abundante do ciclo de vida, representando 90-95% do total de formas encontradas nos pulmões dos indivíduos infectados por *Pneumocystis*.

Esta forma vegetativa é mononuclear, tem cerca de 2-8 µm de diâmetro e é predominantemente haploíde (Cornillot *et al.*, 2002; Dei-Cas *et al.*, 2004) mas a forma diploíde também existe (Wyder *et al.*, 1998).

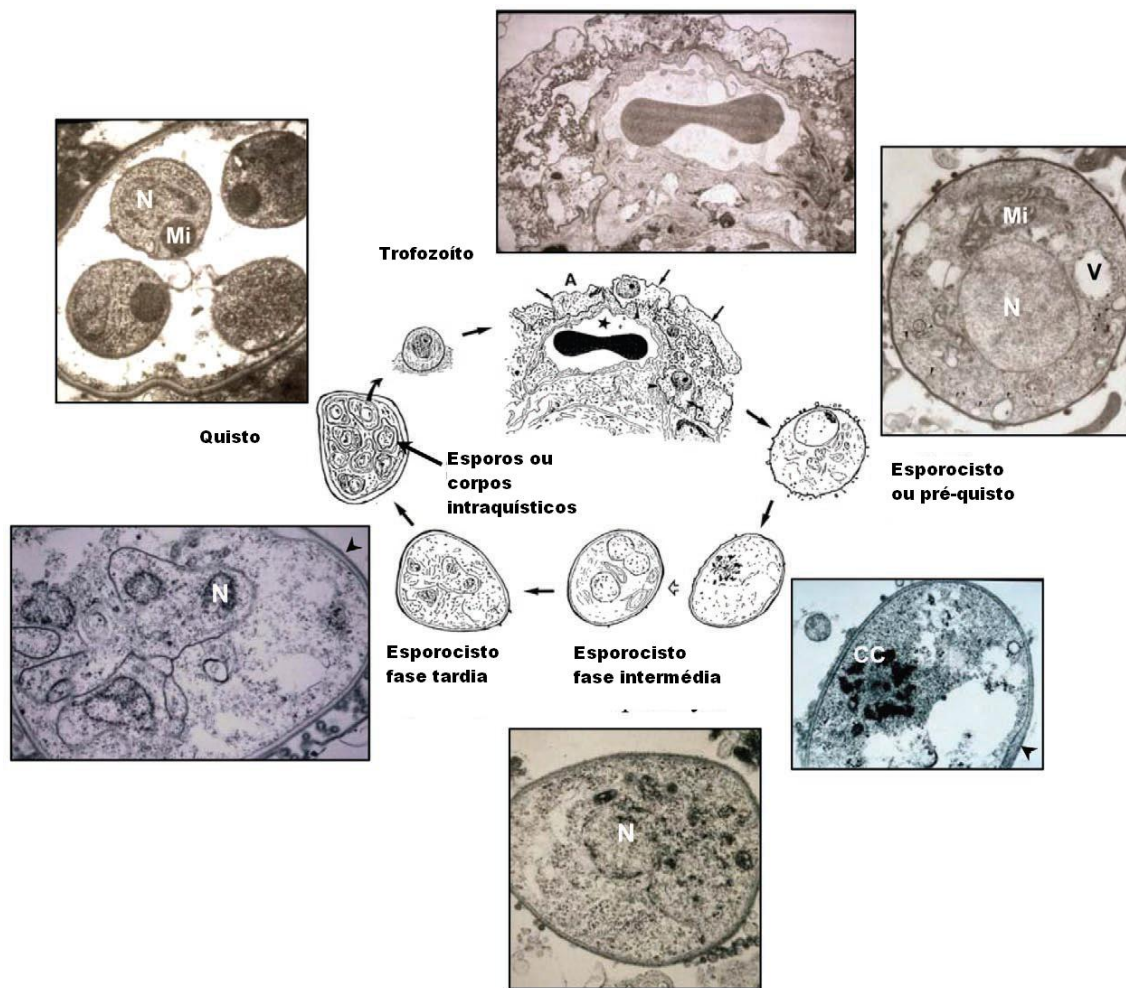


Figura 2. Representação do ciclo de vida de *Pneumocystis* por microscopia electrónica com correspondente adaptação esquemática do desenvolvimento do microrganismo nos pulmões de mamíferos. Trofozoítos (setas pequenas) aderem às células epiteliais alvéolares do tipo I perto dos vasos capilares (estrela). Após a conjugação, os trofozoítos são envolvidos numa fina parede celular formando o esporocisto ou pré-quistos onde existe um complexo de sinaptonemas (Matsumoto & Yoshida, 1984). No esporocisto intermediário, ocorre a divisão nuclear e posterior mitose que leva à formação de uma espessa parede celular na fase final do esporocisto. No quisto os esporos estão perfeitamente delineados, e estão capazes de se libertar do quisto e infectarem novas células. Adaptado de Aliouat-Denis *et al.*, 2009.

(A) espaço alveolar; (CC) cromossomas condensados e microtúbulos; (N) núcleos; (MI) mitocôndria; (V) vacúolo; ► indicam espessamento da parede celular quística.

Os trofozoítos apresentam geralmente uma forma irregular e são facilmente identificados nos pulmões dos animais infectados. Devido à sua forma pleomórfica a

associação dos trofozoítos é muito irregular, formando complexos com muitas interdigitações que, por vezes dificultam a distinção entre os trofozoítos. Muitas vezes é possível visualizar as projecções do citoplasma, conhecidas como filopodia, que permitem ao trofozoíto a aproximação às células epiteliais dos alvéolos (Alliouat-Denis *et al.*, 2008).

O citoplasma dos trofozoítos é pobre em organelos predominando os ribossomas livres, as partículas de glicogénio e estruturas ramificadas tubulares semelhantes a um retículo endoplasmático. Geralmente é possível observar um pequeno núcleo que pode assumir diversas posições, e um nucléolo no centro ou perifericamente em relação ao núcleo (Dei-Cas *et al.*, 1989).

O **esporocisto** ou **pré-quisto** é o estágio de desenvolvimento que antecede a formação do quisto. Caracteriza-se pela presença de um complexo de sinaptonemas no esporocisto inicial, que suportam a ocorrência de meiose. Após a meiose, ocorre replicação mitotótica que origina a formação de oito núcleos na fase final do esporocisto (Matsumoto & Yoshida, 1984). O tamanho do esporocisto varia entre 4-5 μm , no esporocisto inicial, até aos 4-6 μm , no esporocisto final e apresenta geralmente uma forma ovóide.

O **quisto** mede cerca de 4-7 μm de diâmetro (Dei-Cas *et al.*, 2004) tem uma superfície lisa e com pouca filopodia. No quisto existem esporos ou corpos intraquísticos individuais claramente delineados e protegidos por uma parede celular semelhante à dos trofozoítos. Após a maturação total os esporos ou corpos intraquísticos abandonam o quisto.

Estudos recentes demonstraram que um dos principais componentes da parede dos quistos é o β -glucano (De Stefano *et al.*, 1998). Os glucanos representam igualmente um dos principais componentes da parede celular dos fungos relacionados com *Pneumocystis*.

Os β -glucanos são compostos por homopolímeros de moléculas de glucose, na sua maioria, com a ligação glicosídica, entre o carbono 1 e o carbono 3, aos monómeros de glucose, designando-se por isso de β -1,3-glucano. Estudos adicionais utilizando anticorpos anti- β -1,3-glucano permitiram a localização de glucanos na parede dos quistos (Nollstadt *et al.*, 1994). O β -1,3-glucano foi detectado em lavados broncoalveolares de doentes com PPc (Yasuoka *et al.*, 1996).

As proteínas responsáveis pela síntese de β -1,3-glucano medeiam a polimerização da uridina 5'-difosfoglucose em β -1,3-glucano insolúvel, necessário para a formação da parede celular do quisto. Estudos ao nível do β -glucano são importantes como possíveis alvos terapêuticos contra PPc, uma vez que, o processo envolvido para a produção de glucano não está presente nos mamíferos (Kottom & Limpert, 2000).

Os **esporos ou corpos intraquístico** medem cerca de 1-2 μ m e podem assumir diversas formas, arredondada, mais alongada em forma de banana ou irregular, e são constituídos por um único núcleo, um citoplasma denso, uma mitocôndria bem definida, um retículo endoplasmático rugoso, bem desenvolvido, e numerosos ribossomas (Dei-Cas *et al.*, 2004).

1.3 Resposta do sistema imunitário

Pneumocystis jirovecii pensa-se ser adquirido cedo na infância. Esta primo-infecção resulta numa doença sem gravidade que raramente é diagnosticada ou tratada. Foram realizados poucos estudos no sentido de caracterizar a primo-infecção, no entanto, serologicamente foi demonstrada uma resposta imunitária em crianças de pouca idade (Meuwissen *et al.*, 1977; Wakefield, 1995).

A fonte de infecção de origem ambiental é desconhecida, como referido anteriormente, e esta forma infecciosa do microrganismo não permanece nos pulmões, por isso, a ligação entre primo-infecção e pneumocistose não está devidamente esclarecida.

O estudo da resposta imunitária a *Pneumocystis* baseia-se no modelo animal. Embora este seja um instrumento válido no estudo deste microrganismo, tem-se verificado que, no modelo animal é necessário um grande período de imunodeficiência para que ocorra o desenvolvimento da PPc. Além disso, a imunodeficiência neste modelo implica a toma de corticosteróides, para inibir o sistema imunitário do hospedeiro, o que causa alterações ao nível da resposta imunitária e, conseqüentemente, do tempo necessário para obter resultados de parasitémia positiva (Wakefield, 1995).

Actualmente, são utilizados novos modelos animais, mais concretamente murganhos com imunodeficiência severa combinada (SCID) ou com deleção de células

T CD₄⁺ que permitem a obtenção de informação mais fidedignada. (Walzer *et al.*, 1977; Shellito *et al.*, 1990).

Inicialmente verifica-se que, as formas tróficas de *Pneumocystis* aderem às células alveolares do tipo I através da interdigitalização das suas membranas com as do hospedeiro. Esta ligação é facilitada pelas interações com as proteínas, fibronectina e a vitronectina do hospedeiro que se ligam à superfície de *Pneumocystis* e permitem a incorporação de receptores de integração que estão presentes no epitélio alveolar. No tecido infectado, células alveolares do tipo I em contacto com *Pneumocystis* aparecem vacuolizadas e com sinais de erosão. No entanto, não foi demonstrado que o comprometimento pulmonar comum nos doentes com PPc seja causado pela aderência de *Pneumocystis* às células alveolares (Beck & Harmsen, 1998).

Estudos revelam que é necessário ocorrer uma resposta inflamatória para o controlo da pneumonia por *Pneumocystis*, no entanto é esta inflamação exuberante que provoca danos nos pulmões durante a infecção (Thomas & Limper, 2004). No caso das pneumonias severas causadas por este microrganismo, verifica-se a ocorrência de infiltrados de neutrófilos nos pulmões que resultam em danos no tecido alveolar e insuficiência respiratória. De facto, a evolução da doença está mais relacionada com o estado de inflamação dos pulmões do que com a carga parasitária (Limper *et al.*, 1989).

A fagocitose das células infectadas ocorre principalmente ao nível dos macrófagos alveolares. Verifica-se que a função dos macrófagos é igualmente comprometida nos doentes com sida ou cancro, resultando na redução do número de *Pneumocystis* eliminados (Koziel *et al.*, 1998). No modelo animal, quando são utilizadas cobaias com delecção de macrófagos a resolução da PPc é comprometida (Limper *et al.*, 1997).

No entanto, esta não parece ser a principal defesa contra este microrganismo, pois os indivíduos com neutropénia não ficam mais predispostos para contrair a doença quando comparados com indivíduos com outras deficiências do sistema imunitário.

A resposta imunitária principal prende-se com os linfócitos T CD₄⁺, tanto no modelo humano como no animal, em que o risco de infecção aumenta quando os valores de células T CD₄⁺ são inferiores a 200/mm³ (Phair *et al.*, 1990). As células T CD₄⁺ funcionam como células de memória, responsáveis pela activação de células efectoras da resposta inflamatória nomeadamente, os monócitos e os macrófagos. Estudos realizados em murganhos com SCID comprovam que, apesar da existência de macrófagos e neutrófilos funcionantes a inexistência de células B e T funcionantes, leva

a uma progressão rápida da infecção por *Pneumocystis* (Roths *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1999).

Estudos efectuados em ratos com um deficit de células T CD₄⁺, e aos quais foram administrados anticorpos anti-células T CD₄⁺, verificou-se que a infecção por *Pneumocystis* tinha uma evolução crónica e os ratos não conseguiam eliminar o microrganismo dos pulmões (Roths & Sidman, 1992).

Só recentemente foram efectuados estudos no sentido de compreender os mecanismos mediados pelas células T CD₄⁺ activados na presença de *Pneumocystis*. No entanto, verifica-se que tanto o factor de necrose tumoral α (TNF- α) como a interleucina-1 são factores necessários para uma resposta inicial ao nível do pulmão e são mediados pelas células T CD₄⁺. Além disso, o TNF- α é produzido pelos macrófagos alveolares quando ocorre o reconhecimento do β -glucano presente na parede de *Pneumocystis* (Vassalo *et al.*, 2000). Este mediador tem efeitos importantes durante a PPC no sentido em que promove o recrutamento dos neutrófilos, linfócitos e monócitos.

Por sua vez, a presença dos antigénios de *Pneumocystis* gera a proliferação celular e a produção de outros mediadores celulares como, a linfotactina e o interferão gama (IFN- γ) (Beck & Harmsen, 1998). A linfotactina é uma quimiocina que actua no sentido de aumentar o recrutamento dos linfócitos na infecção por *Pneumocystis*. Por sua vez, o IFN- γ actua ao nível dos macrófagos estimulando a produção de TNF- α , superóxidos e espécies reactivas de nitrogénio substâncias utilizadas na defesa do hospedeiro contra *Pneumocystis*. Experimentalmente verificou-se que, a administração de IFN- γ diminui a intensidade da infecção no modelo animal, independentemente do valor de células T CD₄⁺ (Beck *et al.*, 1991).

No entanto, apesar das células T serem essenciais para o controlo da infecção, estas células são também responsáveis pelos danos que ocorrem a nível pulmonar durante a pneumonia. Estudos efectuados em ratinhos com SCID infectados com *Pneumocystis* verificou-se que o funcionamento do pulmão era normal, apesar de terem a infecção activa. Uma vez restabelecido o sistema imunitário do ratinho verificou-se uma intensa resposta inflamatória, por parte dos linfócitos T, que resultou num comprometimento da função respiratória deste. Constata-se assim que, sem a resposta inflamatória *Pneumocystis* tem pouco efeito directo sobre a função respiratória (Wright *et al.*, 1999).

1.4 Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc)

A PPc ou pneumocistose é o nome pelo qual se designou a pneumonia causada por *P. jirovecii*. Este microrganismo é específico do ser humano, não tendo sido demonstrado a infecção noutros animais assim como outras espécies de *Pneumocystis* não têm a capacidade de infectar o Homem.

O termo PPc deriva do facto de *P. jirovecii* ter sido designado anteriormente por *Pneumocystis carinii*, no entanto como o termo já tinha um uso corrente, racionalizou-se que o termo PPc poderia continuar a ser utilizado mas passando a significar **P**neumonia por **P**neumocystis (*jirovecii*).

1.4.1 Epidemiologia

P. jirovecii é frequentemente encontrado nos pulmões de pessoas saudáveis, no entanto a PPc é relativamente rara em indivíduos com sistema imunitário intacto. Esta doença é comum em indivíduos com sistema imunitário comprometido nomeadamente crianças prematuras ou mal nutridas e idosos, mas é nos indivíduos com VIH/Sida que a doença é mais prevalente. (Ryan & Ray, 2004). A PPc pode ainda ocorrer em indivíduos que tomam imunossuppressores após uma intervenção cirúrgica ou em doentes sujeitos a transplantes de órgãos ou de medula óssea (Puzio *et al.*, 2009).

O organismo causador da PPc encontra-se globalmente distribuído pelo que, a doença foi descrita em todos os continentes com excepção da Antártica (Morris, 2004). Estudos realizados sugerem uma grande exposição ao microrganismo, relatando casos em que 75% das crianças com idade inferior a quatro anos apresentavam anticorpos contra *Pneumocystis* (Morris, 2004) e um estudo *post-mortem*, efectuado no Chile, refere que cerca de 65 dos indivíduos num universo de 95, apresentavam *Pneumocystis* nos pulmões (Ponce *et al.*, 2010).

Antes da utilização generalizada da terapêutica profiláctica para a PPc a frequência de infecção por *P. jirovecii* em doentes submetidos a transplantes situava-se entre os 5% e os 25% e, no caso dos doentes com cancro entre 1% e 25%. Actualmente, com a profilaxia, a PPc é pouco frequente em indivíduos com transplante de órgãos sólidos e reduziu drasticamente em doentes infectados com VIH (Morris, 2004).

1.4.2 PPc e VIH/Sida

Desde o começo da epidemia do VIH/Sida, a PPc tem sido associada a esta doença. Como a doença só ocorre em doentes imunocomprometidos o aparecimento da doença pode ser o primeiro sinal para o diagnóstico da sida, caso o doente não tenha outra razão para apresentar deficit do sistema imunitário. No início dos anos 80, verificou-se um aumento do número de casos de PPc na América do Norte e consistiu na primeira pista da existência da epidemia VIH/Sida (Fannin *et al.*, 1982).

Antes do aparecimento de formas mais efectivas de tratamento, a PPc era uma causa de morte comum e rápida nos doentes com sida. Actualmente, a incidência é menor devido à medicação preventiva, que consiste na administração do co-trimoxazole em indivíduos com contagem de células T CD₄⁺ inferior a 200/mm³. Nos doentes com sida que não têm acesso às medidas preventivas a PPc continua a ser das principais causas de morte. Assim apesar da diminuição do número de casos de morte e de doença por VIH nos EUA e na Europa Ocidental, a PPc continua a ser uma doença importante e difícil de ser erradicada. Nos países desenvolvidos, a PPc continua a ocorrer nos indivíduos não diagnosticados com VIH/Sida ou sem assistência médica, indivíduos que não fazem profilaxia para a PPc e ainda, nos que não fazem ou são resistentes à terapêutica antiretroviral potente (HAART). O aparecimento de resistências quer ao nível do VIH quer ao nível de *Pneumocystis*, pode contribuir para o aumento da incidência da doença (Morris, 2004).

Nas regiões em vias de desenvolvimento, pensava-se que a prevalência de PPc seria muito menor (Abouya *et al.*, 1992) mas estudos recentes têm demonstrado que o reduzido número de casos reportados se deve, na verdade, a deficiências no diagnóstico da doença, uma vez que este requer recursos de diagnóstico modernos a que os países menos desenvolvidos não têm acesso. Actualmente, a frequência de infecções por *Pneumocystis* aumentou em África, tendo sido detectado em 80% das crianças VIH positivas com pneumonia. Na África sub-sariana, a tuberculose é uma co-infecção muito comum em indivíduos com PPc (Murray, 2005).

1.4.3 Sintomas

Os sintomas da PPC são geralmente, febre, dispneia e tosse, regra geral, não produtiva ou produzindo pequenas quantidade de expectoração branca. Os doentes podem queixar-se de dor retroesternal típica que piora quando inspiram (Walzer, 2002).

Os sintomas diferem muito de doente para doente pelo que, o diagnóstico clínico deve sempre considerar também o historial clínico do doente. No entanto, verifica-se que nos indivíduos VIH positivos, o início da doença é geralmente subtil e caracteriza-se por semanas de sintomas vagos como febre, queixas pulmonares ou emagrecimento inexplicável, enquanto nos indivíduos VIH negativos os sintomas duram geralmente, uma a duas semanas, começando com discreta taquipneia e em apenas uma semana, pode progredir para a insuficiência respiratória (Walzer, 2002).

Além da pneumonia descrevem-se outros problemas clínicos nos doentes infectados por VIH como resultado da infecção por *P. jirovecii*. As manifestações extrapulmonares mais frequentes são as lesões oftalmológicas da coróide, a vasculite necrosante semelhante à doença de Burger, a hipoplasia de medula óssea e a obstrução intestinal. Mas outros órgãos podem ser afectados como os gânglios linfáticos, o baço, o fígado, o pâncreas, o rim, o pericárdio, o coração, a tiróide e as supra-renais. A infecção dos órgãos pode associar-se a lesões quísticas que podem aparecer calcificadas na Tomografia axial computadorizada (TAC) ou na ultra-sonografia. Apesar de raramente surgirem manifestações extrapulmonares de *P. jirovecii* estas podem ocorrer em doentes a fazer profilaxia nomeadamente com pentamidina por inalação ou em doentes com estado avançado de infecção por VIH, sem a toma de nenhuma profilaxia (Walzer, 2002).

1.4.4 Diagnóstico Presuntivo

A avaliação laboratorial de rotina é geralmente de pouco auxílio no diagnóstico diferencial da PPc. É comum haver discreta leucocitose, embora ela possa ser evidente em doentes com neutropenia prévia.

O doseamento do lactato desidrogenase (LDH) no soro dos doentes parece ser um bom teste de *screening* e de monitorização do tratamento. Estudos realizados recentemente apontam para um aumento do nível de LDH nos indivíduos infectados por *P. jirovecii*. Um estudo realizado em doentes VIH positivos com PPc, observou que 92% dos indivíduos avaliados tinham níveis elevados de LDH (Rani *et al.*, 2000). No entanto, o LDH não é um marcador específico da doença, pois os valores elevados obtidos devem-se à reacção inflamatória e à lesão pulmonar causada pelo microrganismo (Quist & Hill, 1995).

A gasimetria arterial pode indicar hipoxemia com diminuição da pressão parcial de oxigénio arterial (PaO₂), e aumento do gradiente de oxigénio alvéolo-arterial. A gasimetria não só é importante para o diagnóstico da doença como também fornece informações importantes para estabelecer a gravidade da doença e direccionar o tratamento (Walzer, 2002).

Na radiografia ao tórax o resultado mais comum é um radiograma normal caso a doença seja diagnosticada precocemente, ou um discreto infiltrado intersticial bilateral. Os resultados clássicos de infiltrado peri-hilar denso são pouco comum nos doentes com VIH/Sida (Walzer, 2002).

Os critérios de diagnóstico presuntivo de PPc definido pelo Centro de Controlo de Doenças (CDC) para os doentes com HIV/Sida são (CDC, 1980):

1. Dispneia de esforço / tosse recente não produtiva
2. Raio X ao tórax com infiltrado intersticial bilateral
3. Hipóxia arterial
4. Ausência de evidência de pneumonia bacteriana

1.4.5 Diagnóstico Definitivo

Os aspectos clínicos característicos da PPc não são suficientemente específicos para diferenciar a pneumonia por *Pneumocystis* de outras infecções pulmonares oportunistas, além de que podem ocorrer inúmeras reacções cruzadas com outros agentes infecciosos sendo por isso necessário e de grande interesse a utilização de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas.

O diagnóstico definitivo da PPc requer a identificação da presença de quistos ou trofozoítos de *P. jirovecci* em secreções pulmonares obtidas através de diferentes procedimentos tais como, a biópsia transbrônquica (BTB), o lavado broncoalveolar (LBA), a expectoração induzida (EI) ou o lavado oral (LO).

A BTB é o procedimento mais invasivo mas apresenta uma sensibilidade e especificidade de 100% fornecendo a maior quantidade de amostra para diagnóstico. No entanto, este procedimento está reservado para casos raros, normalmente doentes que apresentam resultados negativos nos testes de LBA mas que mantêm a suspeita de PPc.

O LBA é obtido por broncofibroscopia com encravamento do fibroscópio num lobo médio (Gosey *et al.*, 1985). Trata-se de um processo mais caro e mais invasivo que a EI e que envolve o risco de pneumotórax (Baughman *et al.*, 1991). A maioria dos autores atribuem ao LBA uma sensibilidade superior a 90% (Bigby, 1994). A sensibilidade do LBA é inferior em doentes a realizar profilaxia com pentamidina sendo nestes casos indicado a realização de BTB em conjunto com o LBA (Broddus *et al.*, 1985). O LBA deve ser realizado quando há uma forte suspeita de PPc e o resultado da EI é negativo. Este procedimento não é tão útil no caso de recaídas da doença.

A EI obtida por inalação de uma solução salina hipertónica tem sido actualmente, mais utilizada no diagnóstico da PPc em doentes imunocomprometidos, visto ser uma técnica menos invasiva, causando menos desconforto e menos risco para o doente, e com custos menos elevados (Bigby *et al.*, 1986). A EI tem uma sensibilidade que varia entre (50% e os 90%) dependendo da forma como é realizado o teste e do laboratório que processa a análise. A especificidade é elevada variando de 99 a 100% (Bigdy *et al.*, 1986). Verifica-se ainda que a sensibilidade é menor nos doentes sem infecção por VIH, uma vez que a imunodeficiência causada pelo VIH leva normalmente a um aumento do número de *Pneumocystis* presentes nos alvéolos dos doentes. Também pode ser menos sensível em doentes a fazer profilaxia com pentamidina por inalação (Bigdy *et al.*, 1986.)

Estudos mais recentes comprovam que as amostras de LBA, quer em doentes com um sistema imunitário deprimido quer em doentes saudáveis são mais sensíveis para o diagnóstico de infecções fúngicas sendo por isso, as amostras recomendadas para o diagnóstico da PPc (Miller *et al.*, 1991; Da Silva *et al.*, 2007).

Actualmente o diagnóstico da PPc baseia-se na detecção directa do microrganismo por técnicas de coloração histoquímicas ou imunohistoquímicas em amostras pulmonares e posterior observação ao microscópio (Figura 3).

As principais colorações histoquímicas utilizadas no diagnóstico da PPc são a Gomori-metenamina-prata, a Wright-Giemsa, a azul de toluidina e a coloração fluorescente calcoflúor. De salientar que, nenhuma destas colorações é específica para *P. jirovecci* e a identificação do microrganismo baseia-se na morfologia.

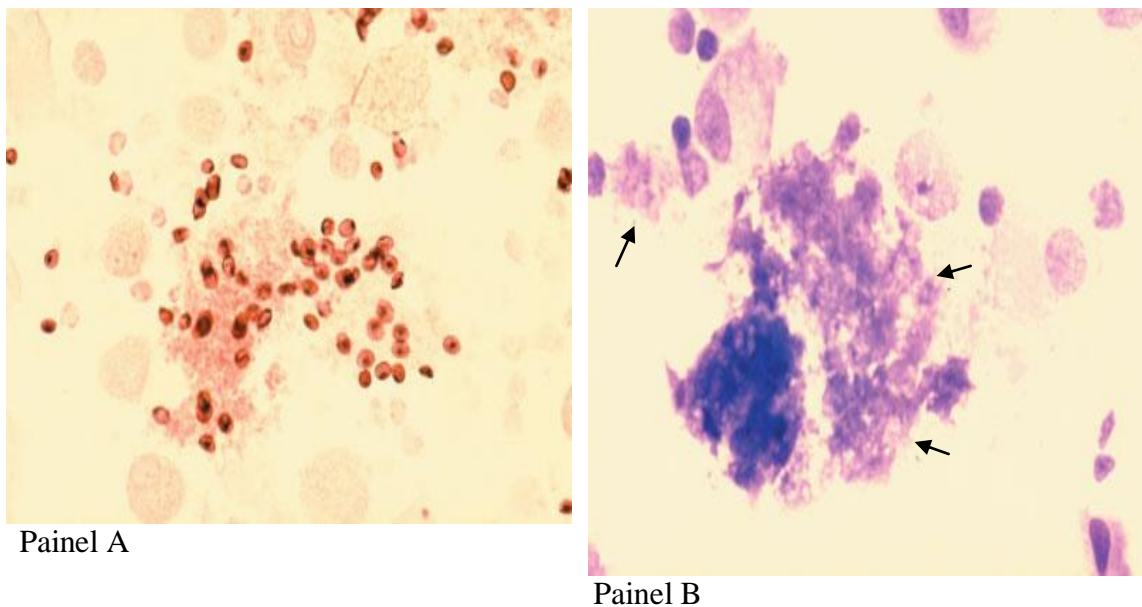


Figura 3. Detecção de diferentes formas de *Pneumocystis* utilizando diferentes colorações. (Thomas & Limper, 2004)

Painel A – Coloração de Gomori-metenamina mostrando formas típicas de quistos de *Pneumocystis* (x100) em amostras de LBA, sendo visível a parede celular do quisto e os esporos no seu interior.

Painel B- Coloração de Wright-Giemsa utilizada para a identificação de trofozoítos (→) de *Pneumocystis* (x100) em amostras de LBA e EI mas requer um número elevado de organismos e experiência na observação.

Outro método de coloração convencional utilizado no diagnóstico da PPc é o da imunofluorescência (IF) directa ou indirecta que é considerada a técnica de referência (Elvin, 1994). Nesta técnica imuno-específica, utilizam-se anticorpos monoclonais que reagem com antígenos específicos de *Pneumocystis*. A estes antígenos ligam-se anticorpos anti-*Pneumocystis* conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) que quando expostos a um determinado comprimento de onda, emitem fluorescência verde-maçã característica (Figura 4). Esta técnica caracteriza-se por ser sensível, específica, rápida e fácil de aplicar além de que, detecta tanto os trofozoítos como os quistos do *P. jirovecii* (Matos *et al.*, 1995). A principal desvantagem desta técnica prende-se com os seus elevados custos requerendo material especializado como, por exemplo, um microscópio de fluorescência e exige a presença de um técnico especializado e experiente (Baughman *et al.*, 1991).

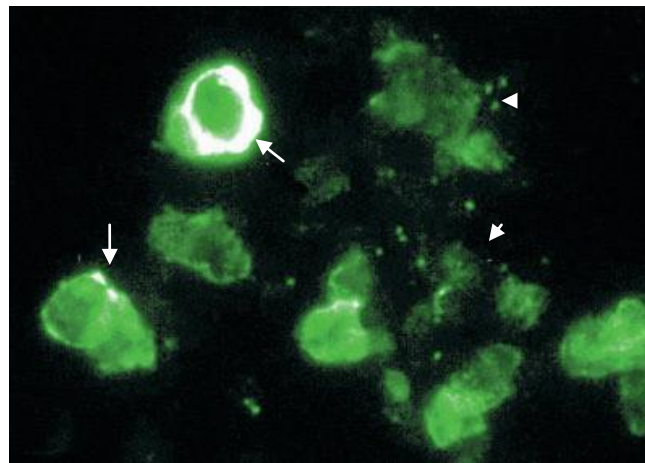


Figura 4 Detecção de diferentes formas de *Pneumocystis* utilizando coloração por Imunofluorescência com ampliação de 400x. → quistos de *Pneumocystis* ► trofozoítos de *Pneumocystis*. Adaptado de (Thomas & Limper, 2004)

Actualmente existem outros métodos de diagnóstico baseados na biologia molecular, como as técnicas de reacção em cadeia de polimerase (PCR) que apresentam elevada sensibilidade e especificidade. A técnica de PCR foi inicialmente aplicada ao diagnóstico da PPc por Wakefield *et al.*, em 1990. Nesta técnica o DNA é extraído das amostras biológicas e de seguida, amplifica-se uma pequena sequência de DNA específico do microrganismo em estudo. As técnicas que apresentam maior

sensibilidade, ou amplificam um gene alvo multicópia utilizando sequências do gene mitocondrial que codifica o RNA da subunidade grande ribossomal e a família de genes das glicoproteínas *major* de superfície (MSGs) ou utilizam um processo de PCR “nested” que requer duas fases de amplificação separadas (Ortona *et al.*, 1996). A técnica de PCR além de quantificar o DNA amplificado, devido à sua elevada sensibilidade, permite detectar um número reduzido de microrganismos, sendo por isso muito utilizada no diagnóstico da PPc, essencialmente na identificação de casos de colonização e ainda em estudos de genotipagem.

Todos os métodos de diagnóstico descritos anteriormente requerem a colheita de secreções pulmonares o que implica a realização de técnicas invasivas difíceis de realizar, principalmente, em doentes com sério comprometimento respiratório. Consequentemente é importante o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico que não incluam a realização de técnicas tão invasivas para o doente, como é o caso do doseamento do (1→3)-β-D-glucano (β-glucano) no soro.

O β-glucano é um componente importante da parede celular de uma grande quantidade de fungos com importância clínica à excepção de *Cryptococcus neoformans* e do *Zygomycetes* (Mitsutake *et al.*, 1996; Miyazaki *et al.*, 1995) e a sua presença no soro é considerada um marcador biológico de infecções invasivas por fungos em estudo clínicos e em autópsias (Ketchum *et al.*, 2004; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2005). O β-glucano é também um componente da parede celular de *Pneumocystis jirovecii*, no entanto, até à data, nenhum dos métodos para a detecção do β-glucano no soro é considerado para o diagnóstico da PPc (Persat *et al.*, 2008).

A primeira publicação a citar a utilização do β-glucano para a detecção de *Pneumocystis* data de 1996 e, consistia no doseamento do β-glucano no LBA e no soro de humanos e ratinhos. Os resultados obtidos sugeriram que a presença de um número elevado de quistos de *Pneumocystis* no espaço alveolar dos pulmões permite a acumulação de níveis elevados de β-glucano que entram na circulação sanguínea (Yasuoka *et al.*, 1996).

O doseamento do β-glucano para o diagnóstico foi muito facilitado com o uso de reagentes de lisado modificado de amebócito *Limulus* (LAL). Os princípios, metodologias e características do LAL para o doseamento do β-glucano foram revistos em 2007 por Finkelman e Tamura (Finkelman & Tamura, 2007).

Em suma, a cascata metabólica de LAL é uma bifurcação de enzimas procoagulantes com dois ligandos possíveis, o lipossacarídeo bacteriano (endotoxina) e o

β -glucano. O LAL pode ser específico para o β -glucano bloqueando ou removendo o factor C da cascata que é activado pela endotoxina (Figura 5) (Iwanaga, 1993). A interacção do β -glucano com o Factor G provoca a activação sequencial da cascata, uma vez activado o Factor G este vai actuar sobre a enzima pro-coagulante. Por sua vez, a enzima coagulante formada vai clivar o substrato, o coagulogénio em péptidos que assumem uma forma de matrix sólida denominada de *gel-clot*.

Comercialmente as preparações de LAL são formuladas com péptidos cromogénicos com grupo terminal carboxi-nitroanilida que produzem uma reacção colorimétrica monitorizada a 405 nm.

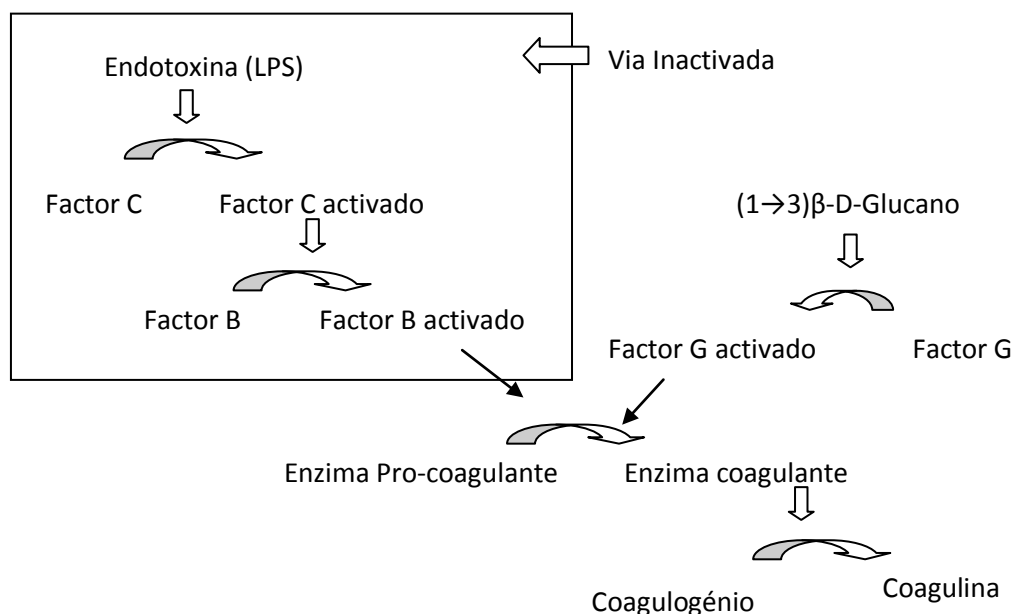


Figura 5. Imagem da cascata metabólica do lisado de amebócitos *Limulus*. Adaptado de Finkelman, 2010.

Recentemente, ensaios colorimétricos têm sido comercializados para a detecção do (1→3) β -D-glucano, nomeadamente o teste Fungitell[®] (Associates of Cape Cod, Inc., Cape Cod, MA) que se baseia numa reacção cinética e que foi aprovado, em 2003, pela U.S. Food and Drug Administration para o diagnóstico presuntivo de infecções invasivas por fungos. Estudos retrospectivos foram realizados no sentido de avaliar o desempenho deste teste no diagnóstico de infecções invasivas a fungos particularmente a aspergilose, a candidíase e a pneumocistose. Os 20 doentes com PPc diagnosticada

apresentaram resultados de β -glucano positivos, 13 (65%) desses apresentaram valores superiores a 500 pg/mL. Em sete dos doentes o resultado do β -glucano no soro foi obtido dias antes de se proceder ao diagnóstico microscópico, através de amostras de LBA (Persat *et al.*, 2008).

1.4.5 Tratamento e Profilaxia

A profilaxia primária contra a PPc em doentes com VIH positivos (incluindo grávidas) e doentes aos quais é administrada HAART deve ser iniciada quando a contagem de células T CD₄⁺ for inferior a 200 células/mm³ ou que apresentem história de candidíase na orofaringe (Masur *et al.*, 2002). Doentes com episódios prévios de PPc devem fazer a profilaxia secundária para toda a vida, a não ser que a HAART consiga restabelecer o sistema imunitário do doente.

As profilaxias primária e secundária devem ser descontinuadas nos doentes VIH positivos, que estiveram a efectuar a HAART e apresentem valores de células T CD₄⁺ superiores a 200 células/mm³ durante três meses, e deve ser re-introduzida sempre que os indivíduos apresentarem, de novo, deficit no sistema imunitário.

Os doentes VIH negativos mas sujeitos a terapêutica imunossupressora, também devem fazer a profilaxia para a PPc. Nos estudos retrospectivos realizados verificou-se que a administração de corticosteróides por mais de oito semanas está associado a um aumento do risco de contrair PPc (Yale & Limper, 1996). O mesmo acontece em doentes com cancro ou com doenças do tecido conectivo e a realizar terapêutica com corticosteróides (Sepkowitz *et al.*, 1992).

O trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) é o fármaco mais eficaz contra o tratamento da PPc severa. No entanto, os efeitos adversos a este fármaco são comuns e doentes com alergias às sulfas não podem fazer esta terapêutica. A administração de corticosteróides pode ser benéfica nos doentes VIH positivos com PPc e com valores de hipoxemia (Safrin *et al.*, 1996). A administração do TMP-SMX juntamente com corticosteróide para diminuir a resposta inflamatória nos doentes com PPc severa continua a ser o tratamento preferencial. Recentemente têm surgido casos de doentes que não respondem ao tratamento com este fármaco o que pode ser devido às múltiplas resistências aos antimicrobianos.

Os fármacos utilizados, hoje em dia, no tratamento da PPC, têm limitações relacionadas com a toxicidade e com a falta de eficácia. Recentemente surgiu um novo conjunto de fármacos com novos alvos terapêuticos, nomeadamente as equinocandinas, fármacos anti-fúngicos que inibem a síntese do β -(1,3)-D-glucano (Schmatz *et al.*, 1995). Utilizando o modelo animal têm sido testadas três equinocandinas (casposfungina, anidulafungina e micafungina) que demonstraram uma elevada eficácia na diminuição do número de quistos de *Pneumocystis* (Cushion *et al.*, 2008).

1.5 Objectivo

O presente estudo tem como objectivo determinar a utilidade clínica do β -glucano como marcador biológico na definição de infecção por *P. jirovecii* e, igualmente, como indicador quantitativo da infecção, útil não só no diagnóstico da primo-infecção como também na monitorização do tratamento.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da amostra

Na realização do presente estudo foram envolvidos 96 indivíduos, 66 desses indivíduos tinham suspeita de PPc e os respectivos produtos biológicos, secreções pulmonares e sangue foram enviados, entre 1995 e 2011, para a Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa, para a realização de diagnóstico laboratorial de PPc. Os restantes 30 indivíduos eram dadores de sangue, constituindo o grupo controlo.

Dos 66 doentes com suspeita de PPc, foi recolhida uma amostra de sangue e uma de secreções pulmonares (35 expectorações induzidas e 31 lavados broncoalveolares). Os produtos biológicos foram recolhidos em duas instituições hospitalares da região de Lisboa e eram acompanhados da respectiva informação clínica.

Assim, do universo de 66 indivíduos verificou-se que 53 eram VIH positivos e os restantes 13 apresentavam informação clínica diferenciada, nomeadamente três com neoplasia, seis transplantados de órgãos, dois recém-nascidos e duas crianças com idades compreendidas entre os 2 e os 6 anos de idade e sem nenhuma imunodeficiência diagnosticada.

2.2 Metodologia

A metodologia aplicada neste trabalho, consistiu em:

- 2.2.1 Processamento de produtos biológicos
- 2.2.2 Diagnóstico parasitológico de *P. jirovecii*
- 2.2.3 Diagnóstico molecular de *P. jirovecii*
- 2.2.4 Detecção do (1→3)-β-D-glucano
- 2.2.5 Processamento da informação clínica
- 2.2.6 Análise de dados

Em suma:

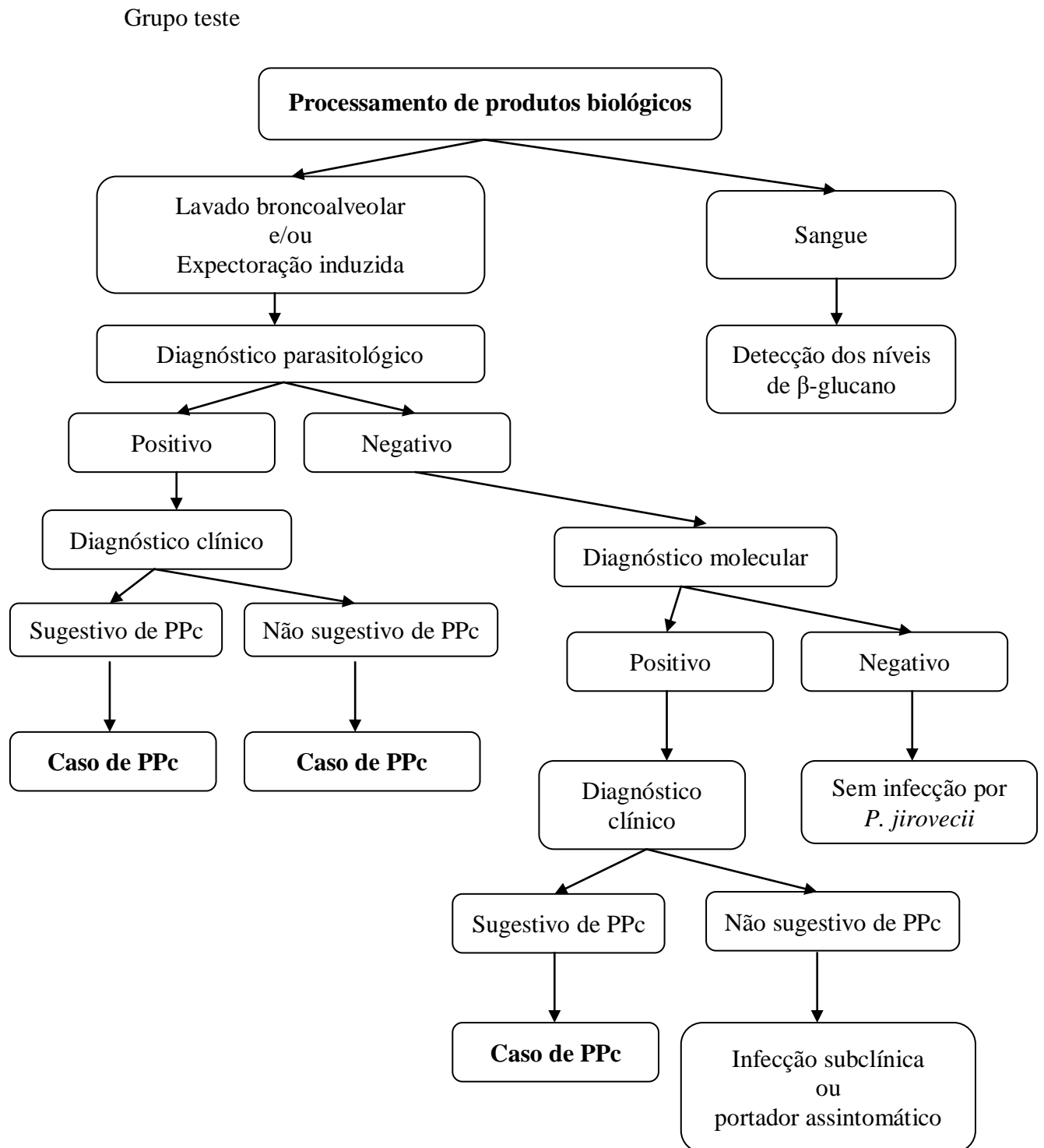


Figura 6. Fluxograma da metodologia aplicada no estudo.

Considerou-se que um diagnóstico clínico sugestivo de PPc subentendia a apresentação clínica compatível com pneumocistose, que corresponde a um conjunto de dados: sintomas, tais como, tosse não produtiva, febre e dispneia; radiograma ao tórax

com imagem de infiltrado intersticial bilateral; e pressão parcial de oxigénio (PaO_2) no sangue periférico inferior a 65 mmHg.

Em relação ao grupo controlo, composto por dadores de sangue, só se recolheram amostras de sangue nas quais foi feita a determinação dos níveis de β -glucano.

2.2.1 Processamento de produtos biológicos

Os produtos depois de darem entrada na Unidade de Protozoários Oportunistas e Outras Protozooses/VIH, do IHMT, foram identificados e, posteriormente, processados. Todo o processamento foi efectuado na “hotte” química, de forma a evitar possíveis contaminações.

a) Processamento de expectoração induzida (EI)

À amostra foi adicionado igual volume de ditionitroto (DTT) (0,1% e água destilada) e a mistura resultante foi agitada vigorosamente no vórtex, durante 15 segundos, até a amostra ficar bem homogeneizada. A mistura foi incubada na estufa a 37°C, durante 30 minutos, para o DTT actuar. Transferiu-se a solução para um tubo de centrífuga, adicionou-se volume igual de tampão de solução salina (PBS) e centrifugou-se a 4000 g, durante 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 0,5 mL de PBS. Caso o muco não tivesse sido todo removido, voltava-se a repetir o procedimento anteriormente descrito.

De seguida, uma única gota (10 μL) desta solução foi colocada no centro de 5 lâminas tratadas com poly-L-lisina que ficaram a secar à temperatura ambiente. O restante sedimento foi transferido para tubos eppendorf de 1,5 mL e armazenado à temperatura de -80°C para posterior utilização. Quando os esfregaços secaram, foram fixados com acetona, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Um dos cinco esfregaços preparados foi utilizado para o diagnóstico parasitológico, enquanto os restantes quatro foram armazenados à temperatura de -20°C para posterior estudo ou diagnóstico de confirmação.

b) Processamento de lavado broncoalveolar (LBA)

Este protocolo foi muito semelhante ao descrito para as amostras de expectoração induzida. No entanto, uma vez que as amostras de LBA não têm muco, o passo inicial, que envolvia a homogeneização com DTT e subsequente incubação, foi omitido. Assim, o processamento de amostra de LBA iniciou-se com a transferência da amostra para um tubo de centrifuga, ao qual foi adicionado uma quantidade suficiente de PBS para perfazer o volume de 10 mL. Esta suspensão foi centrifugada a 4000 g, durante 20 minutos. Os restantes passos foram idênticos aos descritos para as amostras de EI.

c) Processamento de produtos sanguíneos

As amostras de sangue total foram colhidas, por punção venosa, para tubos de plástico esterilizados sem anticoagulante. Após a retracção do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 4000 g durante 10 minutos, e o soro obtido separado para aliquotas esterilizadas, em que o número de alíquotas dependia do volume de soro obtido.

As aliquotas foram armazenadas e conservadas em congeladores a -20°C. Aquando da realização do teste Fungitell[®], as aliquotas foram colocadas à temperatura ambiente e agitadas no vórtex.

As amostras que apresentavam sinais de hemólise, presença de bilirrubina ou turvação devido ao excesso de lípidos foram excluídas. Estudos revelaram que elevadas concentrações de bilirrubina e triglicéridos originam uma inibição da reacção causando falsos negativos enquanto a hemólise causa resultados falsos positivos (Pickering *et al.*, 2005).

2.2.2 Diagnóstico parasitológico - Imunofluorescência indirecta com anticorpos monoclonais para a detecção do *Pneumocystis* (IFI/AcM) Monofluo®Kit *P. carinii* (Bio-Rad)

O diagnóstico de PPc foi levado a cabo por imunofluorescência indirecta utilizando o kit Monofluo® *P. carinii* (Bio-Rad). Esta técnica é considerada a técnica de referência para o diagnóstico de PPc.

Na primeira utilização deste kit, reconstituiu-se a enzima, adicionando-se 250 µL de ácido clorídrico (HCl) 0,001 M (R5) à solução de enzima concentrada (R4).

Este protocolo iniciou-se com a diluição da tripsina, enzima envolvida na hidrólise de ligações peptídicas estabelecida entre proteínas. Assim, diluiu-se 2 µL da enzima em 18 µL de diluente da enzima, perfazendo um volume total de 20 µL. Este volume foi espalhado suavemente sobre a lâmina de forma a cobrir todo o esfregaço. Posteriormente, a lâmina foi a incubar em câmara húmida a 37°C, durante 30 minutos, tempo necessário para a enzima actuar sobre a parede celular dos quistos de *P. jirovecii*, o que torna os antígenos de superfície mais expostos e acessíveis ao anticorpo. Caso se exceda os 30 minutos de incubação, ocorre a digestão excessiva da parede dos quistos, o que poderá dificultar a sua identificação. De seguida, lavou-se a lâmina com PBS e deixou-se secar à temperatura ambiente.

Sobre o esfregaço seco, aplicou-se 20 µL do anticorpo monoclonal (R1) que foi a incubar em câmara húmida a 37°C. Após 15 minutos de incubação, lavou-se a lâmina com PBS e ficou a secar à temperatura ambiente.

Aplicou-se 20 µL de anticorpo anti-rato conjugado com FITC (R2) sobre o esfregaço e foi a incubar em câmara húmida a 37°C, durante 15 minutos. Após esse período de tempo, lavou-se a lâmina com PBS e deixou-se secar.

Por fim, adicionou-se uma gota de meio de montagem (R5) à lâmina, cobriu-se com uma lamela e o esfregaço foi observado ao microscópio de fluorescência, a um comprimento de onda de 475 nm. Os quistos de *P. jirovecii* foram identificados pelo brilho verde-amarelado emitido pela fluorescência, pela sua característica oval e ainda pelo seu tamanho. Os esfregaços com dois ou mais quistos foram considerados positivos, e quando apenas apresentavam um quistos foram classificados como inconclusivos e o teste foi repetido. Os esfregaços onde não foram detectados quistos fluorescentes, foram considerados como negativos. No entanto, nos casos em que

permaneceu uma forte suspeita clínica de infecção por *P. jirovecii*, o teste foi repetido utilizando um inóculo mais concentrado, de forma a evitar um falso negativo.

Além do diagnóstico qualitativo anteriormente descrito, as amostras pulmonares deste estudo foram classificadas quanto à parasitémia. Assim, procedeu-se à semi-quantificação do número de quistos observados nos esfregaços segundo os critérios descritos no quadro 1.

Quadro 1. Diagnóstico semi-quantitativo dos quistos de *P. jirovecii* por IFI/AcM

Parasitémia	Número de quistos de <i>P. jirovecii</i> detectados por IFI/AcM (x1000)
Baixa	Nenhum quisto identificado em 30 campos (positivo por PCR)
Moderada	1 a 30 quistos detectados em 30 campos
Elevada	2 ou mais quistos detectados num campo

2.2.3 Diagnóstico molecular de *P. jirovecii*:

O diagnóstico molecular foi efectuado em amostras que apresentavam um resultado da IFI/AcM para a detecção de quistos de *Pneumocystis* negativo.

Este diagnóstico implicava a realização da extracção de DNA genómico do microrganismo, pelo método Mini-BeadBeeter/Tiocianato de Guanidina-sílica, e posteriormente a amplificação e detecção de um segmento de DNA específico [*mt*(LSU)*rRNA*] através da técnica de PCR “*nested*”.

a) Extracção de DNA pelo método Mini-BeadBeeter/Tiocianato de Guanidina-sílica (adaptado de Boom *et al.*, 1990 ; Costa *et al.*, 2005).

O procedimento iniciou-se com a lise de quistos. Pesou-se 0,3 g de partículas de zicórnio com 0,5 mm de diâmetro e colocou-se em tubos de 2 mL, a estas adicionou-se 900 µL de tampão de lise, 60µL de álcool isoamílico e, por último, 400 µL de amostras de secreções pulmonares. Os tubos foram colocados no aparelho mini-beadbeeter (Biopec Products-HowardTM Industries), onde ficaram a agitar vigorosamente durante 2 minutos, à velocidade máxima. O uso do tampão de lise, juntamente com as partículas de zicórnio, permitiu o rebentamento mecânico da parede celular dos quistos. O ácido isoamílico é um solvente orgânico, que penetra na parede do quisto, e remove o excesso de gordura e outras substâncias que constituem potenciais inibidores da PCR.

Após a agitação no mini-beadbeeter, as amostras foram centrifugadas à velocidade máxima de 19000g durante 15 segundos, de forma a sedimentar os detritos solúveis, as partículas de zicórnio e a espuma produzida durante o processo de agitação. Por fim, transferiu-se o sobrenadante resultante da centrifugação para um tubo de eppendorf estéril de 1,5 mL.

Em seguida, procedeu-se à adsorção de DNA que consiste na adição de partículas de sílica, substância com elevada afinidade para o DNA. Adicionou-se 40µL da suspensão aquosa de sílica em pó (1% pH 2,0; Sigma) ao sobrenadante obtido, a mistura foi agitada vigorosamente e deixada a incubar à temperatura ambiente, num agitador rotativo (Froel Labortechnik GmbH), durante 30 minutos. A amostra foi novamente centrifugada à velocidade máxima (19000g), desta vez durante 10 segundos, com o objectivo de sedimentar a sílica com o DNA absorvido. No fim, desprezou-se o sobrenadante.

Um passo importante a ter em consideração durante o processo de extracção de DNA são as lavagens. Cada lavagem consistiu na ressuspensão da sílica na solução ou solvente apropriados e centrifugação à velocidade máxima durante 1 minuto. Primeiro realizaram-se duas lavagens com 200 mL de tampão de lavagem, de modo a eliminar os contaminantes e as partículas de interferência que se ligam à sílica. De seguida, uma lavagem com 200 mL de etanol a 80% e outra com 200 mL de acetona absoluta por forma a solver completamente o material orgânico contaminante. A acetona foi de seguida desprezada e o tubo foi a secar no aparelho Block Heater (Stuart scientific) a 70°C até à evaporação completa do solvente.

Por fim procedeu-se à eluição do DNA, ressuspensando-se a sílica com o DNA em 50µL de água destilada estéril, previamente aquecida a uma temperatura de 60°C. Os tubos foram deixados a incubar a 70°C durante 10 minutos (Block Heater), de modo a facilitar a eluição do DNA isto é, a passagem das partículas de DNA da sílica para a água. De seguida, procedeu-se à sedimentação da sílica através da centrifugação, à velocidade máxima durante 2 minutos, e recolheu-se o sobrenadante com o DNA dissolvido em tubos de eppendorf de 1,5mL. Os tubos foram devidamente identificados e guardados a uma temperatura de -20°C.

b) Amplificação de DNA pela *mtLSU rRNA* - PCR “*nested*”

(adaptado de Wakefield *et al.*, 1990)

Esta técnica foi composta por duas fases distintas de amplificação, com a utilização de dois conjuntos de *primers*, em que a sequência alvo da segunda amplificação encontrava se inserida na primeira. O produto final desta amplificação foi um fragmento de DNA de 263 pares de bases (pb).

As sequências e *primers* utilizadas nas duas fases de protocolo são descritas no quadro 2.

Quadro 2. Sequências dos *primers* utilizados na amplificação do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii* por PCR “*nested*”. A - adenina; T - timina; C - citosina; G - guanina.

PCR	<i>primer</i>	Sequência
1ª parte (<i>primer exterior</i>)	pAZ 102-E pAZ 102-H	(5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3') (5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3')
2ª parte (<i>primer interior</i>)	pAZ 102-X pAZ 102-Y	(5'-GGTATAGCACTGAATATCTC-3') (5'-AATTACTGTTCTGGGCTGTT-3')

As duas reacções de *P. jirovecii* *mtLSU rRNA* - PCR “*nested*” são idênticas. Assim ambas as reacções foram realizadas para um volume final de 50 µL, contendo tampão de reacção 1x (67 mM Tris-HCl, [pH 8,8], 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Applied Biosystems), 0,75 unidades (U) de enzima de polimerização Biotaq™ DNA polimerase (Bioline), 0,2µM do *primer* exterior pAZ 102-E e pAZ 102-H (MWG Biotech), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Bioline), 0,01 µg de albumina sérica bovina (BSA) (SIGMA), 2µL de amostra de DNA e por fim, água destilada estéril até perfazer o restante volume. Na segunda PCR, à mistura reaccional, preparada nas mesmas condições que a primeira, adicionou-se 2 µL do DNA amplificado na primeira reacção de PCR. A única diferença entre as duas etapas foi que na segunda utilizaram os *primers* internos pAZ 102-X e pAZ 102-Y.

Em cada reacção de amplificação utilizou-se um controlo positivo, que consistia numa suspensão de DNA de *P. jirovecii*, e um controlo negativo, contendo apenas a mistura reaccional, sem a adição de DNA. Todo o material utilizado foi primeiro esterilizado com ultravioletas numa câmara de fluxo laminar, onde também decorreu todo o protocolo, terminou-se esta fase com a colocação dos tubos de PCR no termociclador (Biometra® T1 Thermocycler) segundo as condições térmicas descritas no quadro 3.

Quadro 3. Condições térmicas aplicadas na PCR “*nested*”, para amplificação específica do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*.

PCR	Condições de amplificação	Nº de ciclos
	Desnaturação inicial 95°C, 3min	
1ª PCR	Desnaturação 95°C 1,5 min;	40
e	Ligação 55°C, 1,5 min;	
2ª PCR	Extensão 72°C, 2 min	
	Extensão final 72°C, 10 min	

c) Visualização de DNA amplificado

O DNA amplificado por PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose, para posterior avaliação dos produtos de amplificação. A 10 μ L de produto de reacção, adicionou-se 1 μ L de tampão de amplificação (Fermentas). Da mesma forma, a 1 μ L de marcador molecular (Gene Ruler™ 100 pb; Fermentas) adicionou-se 1 μ L de tampão de aplicação e 9 μ L de água desionizada estéril. Numa tira de electroforese aplicou-se um gel de agarose a 2% (m/v) (SeaKem® LE; FMC BioProducts), em tampão TAE 1x (Tris-Acetato 0,04M; EDTA 0,001 M; pH 8,3) no qual, foi incorporado brometo de etídio (SIGMA) a uma razão de 0,5 mg/L. As amostras foram aplicadas nos respectivos poços e efectuou-se a separação electroforética a 70 volts durante 1 hora. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por acção de luz ultravioleta, num transiluminador (ECX-20M; Vilber Lourmat). Os resultados foram registados com uma máquina fotográfica digital do sistema de aquisição de imagem, incorporado no transiluminador (PowerShot A710 IS; Canon). O DNA intercalado com as moléculas de brometo de etídio tornaram-se fluorescente sob luz ultravioleta. No fim, todas as amostras contendo DNA amplificado emitiram uma fluorescência característica, fornecida pelo brometo de etídio.

2.2.4 Detecção do (1 \rightarrow 3) β -D-glucano - Teste Fungitell® (Associates of Cape Cod, Inc., Cape Cod, MA)

O primeiro passo na utilização do teste Fungitell® consistiu na preparação dos reagentes para a curva de calibração. Dissolveu-se um frasco padrão de glucano em 2800 μ L de *Reagente Grade Water* (RGW) e agitou-se no vórtex, durante 30 segundos, para uma completa dissolução da solução, que tinha uma concentração de 100 pg/mL. Posteriormente efectuaram-se diluições seriadas utilizando-se 500 μ L da solução padrão e 500 μ L de RGW.

No final, obteve-se 5 soluções com as seguintes concentrações: 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12,5 pg/mL e 6,25 pg/mL. Como o volume de calibradores utilizado é 5x superior ao volume de amostra, as concentrações são convertidas em 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL e 31 pg/mL, respectivamente.

O passo seguinte consistiu na preparação do reagente de pré-tratamento do soro, composto por 900µL de 1,2M cloreto de potássio (KCl) e 900µL de 0,25M hidróxido de potássio (KOH). Este reagente foi responsável pela conversão dos glucanos de fita tripla a glucanos de fita simples que reagem melhor ao teste (Aketagawa *et al.*, 1993). Além disso, o elevado pH inativa as proteases serinas e os inibidores das proteases serinas o que podia dar como resultado a obtenção de falsos positivos ou falsos negativos, respectivamente (Tamura *et al.*, 1994).

Na placa de reacção, pipetou-se nos poços designados por **UK** (quadro 4), 20 µL de reagente de pré-tratamento e 5 µL do soro das amostras, sendo que cada amostra foi feita em duplicado. Depois de pipetadas as amostras, a placa foi agitada durante 5 a 10 segundos e foi a incubar, durante 10 minutos a 37°C, no leitor/ incubador de placas infiniteM200Pro da Tecan.

Durante o período de incubação, procedeu-se à reconstituição do reagente Fungitell® com 2800 µL de RGW e 2800 µL de *Pyrosol Reconstituton buffer*, agitando-se suavemente para uma completa dissolução. Este reagente é modificado no sentido de eliminar o Factor C da cascata metabólica de modo a que só ocorra reacção na presença de β-glucano (figura 4).

Após a incubação, retirou-se a placa do aparelho e adicionou-se 25 µL das diferentes concentrações de soluções da curva padrão nos poços **ST** (quadro 4). O poço **ST1** tinha a solução mais concentrada e o **ST5** a menos concentrada. No poço **NEG** pipetou-se 25 µL de RGW. De seguida, adicionou-se 100 µL do reagente Fungitell® a cada um dos poços e inseriu-se a placa no leitor a 37°C, com agitação constante de 5-10 segundos. As leituras foram feitas a 405 nm e a 490 nm (branco de referência), até completar 60 ciclos.

Quadro 4. Esquema da placa de reacção utilizado no estudo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1										
B	ST2	ST2			UK1	UK4	UK7	UK10	UK13	UK16	UK19	
C	ST3	ST3			UK1	UK4	UK7	UK10	UK13	UK16	UK19	
D	ST4	ST4			UK2	UK5	UK8	UK11	UK14	UK17	UK20	
E	ST5	ST5			UK2	UK5	UK8	UK11	UK14	UK17	UK20	
F	NEG	NEG			UK3	UK6	UK9	UK12	UK15	UK18	UK21	
G					UK3	UK6	UK9	UK12	UK15	UK18	UK21	
H												

No fim dos 60 ciclos, obteve-se em cada poço de reacção, uma curva semelhante à curva representada na figura 7, em que, o eixo das ordenadas (yy) correspondia à concentração de produto formado, medida em absorvância e o eixo das abcissas (xx) o tempo, em minutos.

No final do ensaio, obteve-se o valor da velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) de cada reacção. Este valor corresponde ao momento em que o produto formado atinge o ponto acima do qual só ocorrem aumentos insignificantes, na velocidade inicial de reacção (V_0) mesmo com o aumento de substrato. O valor de $V_{\text{máx}}$ foi calculado por um programa informático incorporado no equipamento infiniteM200Pro. Posteriormente foi traçada uma curva padrão, em que cada concentração dos pontos da curva de calibração corresponde a um valor de $V_{\text{máx}}$ (figura 8).

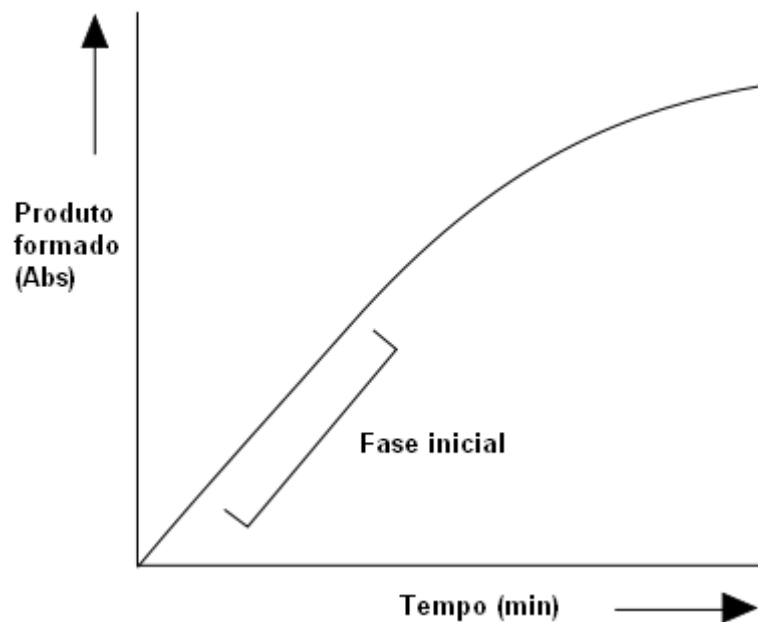


Figura 7. Representação esquemática de uma curva de cinética enzimática da cascata metabólica de LAL activada pelo β -glucano.

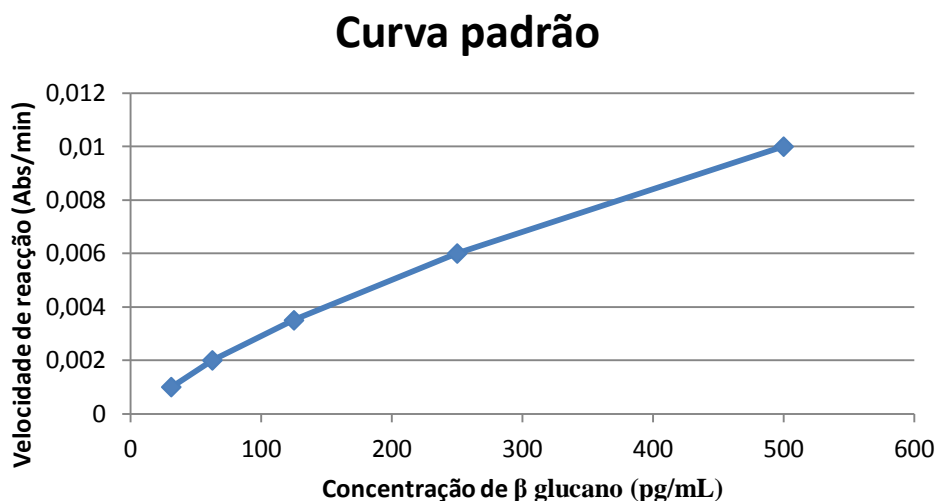


Figura 8. Representação esquemática de uma curva padrão de concentração de β -glucano em função de $V_{m\acute{a}x}$.

Para o teste ser considerado válido foi necessário o cumprimento de determinados critérios, nomeadamente o coeficiente de correlaao (R) da curva padrão ser superior a 0,980 e os controlos negativos uma variaao de densidade óptica (V_{mean}) inferior a 50% do valor do padrão mais baixo. Os resultados foram expressos em pg/mL e os limites de deteção da técnica situavam-se entre os valores iguais ou superiores a 31 pg/mL e os valores iguais ou inferiores a 500 pg/mL. A técnica referia que os valores superiores a 500 pg/mL deveriam ser diluídos com RGW e testadas novamente. No entanto, neste estudo, e dado o facto das amostras terem sido testadas em duplicado, não foram efectuadas diluiao das amostras e consideraram-se os valores absolutos obtidos. A interpretaao dos resultados encontra-se esquematizada no quadro 5.

Quadro 5 Interpretaao dos resultados do teste Fungitell[®] para a deteção do β -glucano.

Resultado	Interpretaao
>80 pg/mL	Positivo
<60 pg/mL	Negativo
60-79 pg/mL	Indeterminado

2.2.5 Processamento da informação clínica

A informação clínica consistiu na recolha de dados relativos ao diagnóstico, à evolução clínica, à contagem de células T CD₄⁺, e aos regimes profilático e terapêutico instituídos. Toda a informação cedida para a realização deste estudo foi aprovada pelos comités de ética das instituições envolvidas.

O diagnóstico clínico da PPc consistia na presença de pelo menos duas das seguintes variáveis:

- sintomas como tosse não produtiva, febre e dispneia;
- radiograma do tórax sugestivo (imagem do infiltrado intersticial bilateral);
- PaO₂ inferior a 65 mmHg.

Outro factor importante a ter em conta na informação clínica foi a contagem de células T CD₄⁺ tendo sido considerados 3 grupos distintos:

- grupo de baixo risco - contagem é < 200 células/mm³
- grupo de risco moderado - contagem se situa entre as 50 - 200 células/mm³
- grupo de alto risco - contagem é < 50 células/mm³

Relativamente à evolução clínica, consistia na avaliação de factores como a resposta à terapêutica anti-*P. jirovecii* e à sobrevivência após o diagnóstico de PPc. Assim, um caso com evolução clínica favorável, era compatível com uma resposta favorável à terapêutica anti-*P. jirovecii* conjuntamente com a sobrevivência do doente durante, pelo menos, quatro semanas após o diagnóstico da infecção. Por sua vez, a evolução clínica desfavorável corresponde a um caso onde se verifica uma resposta desfavorável à terapêutica anti-*P. jirovecii*, isto é, insucesso na melhoria do estado clínico do doente após 10 ou mais dias de administração do fármaco, em dose terapêutica, ou quando o doente morre na sequência do episódio de PPc.

Outro factor que foi tido em conta na informação clínica deste estudo foi a profilaxia, a qual corresponde à toma de um comprimido de TMP-SMZ forte diariamente, ou três comprimidos de TMP-SMZ forte, por semana, por um período de dois meses. Por sua vez, a terapêutica consiste na toma de 15 a 20 mg/kg/dia de TMP associado a 75/100 mg/kg/dia de SMZ fornecido em 3 a 4 doses diárias por via oral ou

endovenosa, durante 21 dias. Neste estudo apenas foi tido em conta o TMP-SMZ visto este ser considerado a associação de fármacos de primeira linha no combate à PPc.

2.2.6 Análises de dados

A análise dos dados obtidos permitiu avaliar a fiabilidade do teste do β -glucano utilizando medidas estatísticas como a sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e ainda a curva de ROC (característica de operação do receptor). Utilizou-se o teste do qui-quadrado (χ^2) e o Teste Exacto de Fisher para estudar a associação entre duas variáveis qualitativas. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para determinar a diferença entre a distribuição dos valores de β -glucano no soro em diferentes categorias de doentes (Guimarães & Cabral, 1997). Os testes estatísticos foram aplicados com um grau de significância de 0,05, ou seja, considerou-se que o p é estatisticamente significativo quando igual ou inferior a 0,05. Foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para realizar os diferentes testes estatísticos.

3. Resultados

Num universo de 96 indivíduos estudados, 66 tinham diagnóstico suspeito de PPc e os restantes 30 eram dadores de sangue. Os dadores de sangue eram indivíduos saudáveis com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos. Os indivíduos com suspeita de PPc tinham idades compreendidas entre os 0 e os 59 anos de idade, com uma média de idade de 34 anos. Relativamente ao género, a maior percentagem, cerca de 79%, pertencia ao género masculino.

O quadro 6 sumariza a informação clínica e os parâmetros da doença que foram tidos em conta neste estudo, tais como, a contagem de células T CD₄⁺, o regime profiláctico e terapêutico, a evolução clínica e, ainda, o diagnóstico laboratorial.

Verificou-se que a maioria dos doentes não se encontrava sob profilaxia ou terapêutica anti-*P. jirovecii*. Da mesma forma na maioria dos doentes (61%) a evolução clínica era desconhecida. Esta falta de informação deveu-se em grande parte ao facto da informação clínica fornecida para este estudo ter sido efectuada na altura da entrada do doente na unidade hospitalar, e os dados posteriores ao tratamento não foram mencionados ou indexados à informação clínica fornecida. Em relação ao nível de células T CD₄⁺, a maior percentagem situou-se no intervalo inferior a 50 células/mm³.

Neste estudo, procedeu-se à realização do diagnóstico de PPc nas secreções pulmonares recolhidas dos 66 indivíduos com suspeita da doença através da técnica de IFI e da técnica de PCR. Dos 66 doentes estudados 54 (81%) apresentaram um resultado positivo para *P. jirovecii* nas secreções pulmonares pelas técnicas de diagnóstico efectuadas, sendo que, a maior percentagem (36% - 24/66) correspondiam a uma baixa carga parasitária, isto é, nenhum quisto foi identificado em 30 campos de microscopia embora as amostras tenham sido positivas por PCR. Quanto ao diagnóstico definitivo, que tem em conta, além dos resultados laboratoriais obtidos, o diagnóstico clínico verificou-se que 47 (71%) dos doentes foram diagnosticados com PPc; 7 (11%) foram considerados portadores assintomáticos pois apenas apresentaram resultado positivo por PCR sem sintomatologia clínica de PPc; e 12 (18%) foram considerados negativos para *P. jirovecii*.

Quadro 6. Parâmetros clínicos, imunológicos e laboratoriais dos 66 indivíduos com suspeita de PPc, em estudo.

Parâmetros clínicos	Número (%) de indivíduos
Diagnóstico Clínico de PPc	
Não sugestivo de PPc	14 (21)
Sugestivo de PPc	52 (79)
Contagem de células T CD4⁺	
> 200 células/mm ³	7 (11)
50-200 células/mm ³	20 (30)
< 50 células/mm ³	22 (33)
Sem informação	17 (26)
Parasitêmia	
Negativo para <i>P. jirovecii</i>	12 (18)
Baixa	24 (36)
Moderada	18 (27)
Elevada	12 (18)
Diagnóstico de PPc	
Caso de PPc	47 (71)
Infecção sub-clínica ou portador assintomático	7 (11)
Sem infecção por PPc	12 (18)
Profilaxia	
Sem profilaxia anti- <i>P. jirovecii</i>	41 (62)
Dose profilática de TMP-SMX	18 (27)
Sem informação	7 (11)
Terapêutica	
Sem regime terapêutico anti- <i>P.jirovecii</i>	32 (49)
Dose terapêutica TMP-SMX	28 (42)
Sem informação	6 (9)
Evolução Clínica	
Negativa	6 (9)
Positiva	20 (30)
Sem informação	40 (61)

Em paralelo aos testes de diagnóstico, anteriormente mencionados, para as secreções pulmonares, procedeu-se à realização do doseamento do β -glucano nas amostras de soro dos 96 indivíduos, 30 dadores de sangue e 66 com suspeita de PPc.

No grupo controlo no qual, apenas se procedeu ao doseamento do β -glucano obteve-se uma mediana de 31 pg/mL, valor que corresponde ao limite mínimo de detecção da técnica. De salientar que, estes resultados não foram considerados na análise estatística, apenas serviram como controlo negativo pois a população saudável não possui habitualmente níveis elevados de β -glucano em circulação.

Em relação aos restantes 66 indivíduos, verificou-se que os 47 (71%) com diagnóstico de PPc apresentaram uma mediana de β -glucano de 314,5 pg/mL. E desses, 20 (43%) apresentaram valores superiores a 500 pg/mL limite superior da técnica. Os sete portadores assintomáticos, isto é, os indivíduos assintomáticos, em que *P. jirovecii* apenas foi detectado através da técnica de PCR, apresentaram uma mediana de 63,7 pg/mL, e por último nos 12 (18%) indivíduos sem infecção por *P. jirovecii*, a mediana de valores de β -glucano foi de 66,5 pg/mL. Os resultados encontram-se esquematizados no quadro 7.

Relativamente à parasitémia verificou-se que, nos 12 (18%) indivíduos em que não foi detectado nenhum quisto de *P. jirovecii* a mediana de β -glucano obtida foi de 66,5 pg/mL enquanto nos restantes 54 (82%) indivíduos, em que foi detectada a presença de *P. jirovecii* nas secreções pulmonares, os níveis de β -glucano obtidos foram substancialmente superiores. Nos indivíduos com baixa parasitémia, isto é, quando *P. jirovecii* apenas foi detectado pela técnica de PCR obteve-se uma mediana de β -glucano de 253,5 pg/mL, na parasitémia moderada a mediana de valores foi de 384,5 pg/mL e na parasitémia elevada a mediana de valores de β -glucano foi de 495,9 pg/mL (quadro 7).

No que diz respeito, à evolução clínica, apesar de cerca de 40 (61%) dos indivíduos terem uma evolução clínica desconhecida, verificou-se que, nos 20 indivíduos com evolução clínica positiva a mediana de β -glucano obtida foi de 243,7 pg/mL enquanto nos 6 indivíduos com evolução clínica negativa a mediana foi de 418,7 pg/mL (quadro 7).

Quadro 7. Diagnóstico de PPc, parasitemia e evolução clínica dos 66 indivíduos com suspeita de PPc, em estudo, em função dos níveis de β -glucano.

Diagnóstico de PPc	Número (%) de indivíduos	Mediana de β-glucano
Caso de PPc	47 (71)	314,5 pg/mL
Infecção sub-clínica	7 (11)	63,7 pg/mL
Sem infecção PPc	12 (18)	66,5 pg/mL
Parasitemia		
Negativo para <i>P. jirovecii</i>	12 (18)	66,5 pg/mL
Baixa	24 (36)	253,5 pg/mL
Moderada	18 (27)	384,5 pg/mL
Elevada	12 (18)	495,9 pg/mL
Evolução Clínica		
Negativa	6 (9)	418,7 pg/mL
Positiva	20 (30)	243,7 pg/mL

Os gráfico da figura 9 e 10 representam a distribuição dos valores de β -glucano nos indivíduos com e sem PPc e nos indivíduos com e sem diagnóstico sugestivo de PPc, respectivamente. Nestes gráficos estão representados os percentis 25 e 75 que correspondem aos limites inferiores e superiores das “caixas”, respectivamente e a mediana que corresponde à linha horizontal dentro das “caixas”. A mediana é uma medida de tendência central que permite separar um grupo de dados em que 50% dos indivíduos terá valores superiores à mediana e os outros 50% valores inferiores. Os traçados diametralmente opostos correspondem aos percentis 10 e 90. As linhas a tracejado representam o limite superior e inferior da técnica, 500 e 31 pg/mL, respectivamente. Neste estudo consideraram-se os valores absolutos obtidos, isto é, apesar dos limites padrão do método, todos os valores determinados durante os ensaios foram utilizados para desenhar os gráficos.

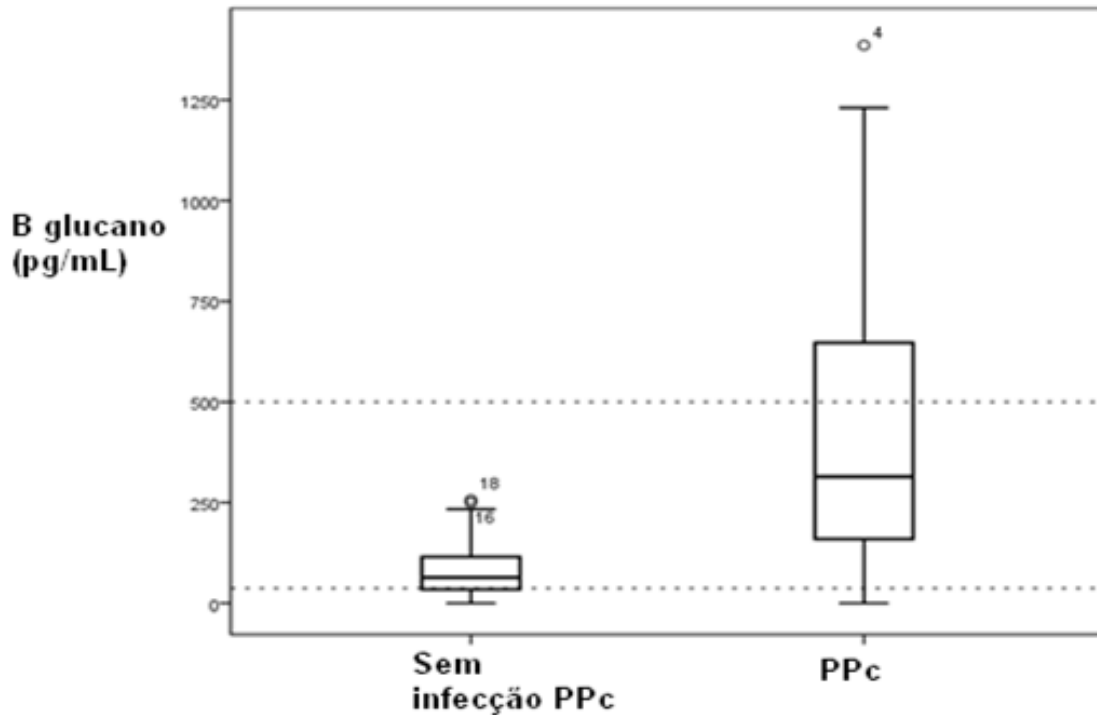


Figura 9. Gráfico da distribuição dos níveis de β -glucano obtidos nos indivíduos com e sem PpC.

Na análise do gráfico da figura 9, verificou-se que a mediana obtida para os valores de β -glucano nos indivíduos com PpC foi de 314,5 pg/mL, com um valor máximo de 1386 pg/mL enquanto, nos indivíduos sem infecção por *P. jirovecii*, a mediana foi de 63,7 pg/mL.

No estudo da correlação entre as variáveis ausência e presença de PpC e a média de valores de β -glucano, obteve-se um p inferior a 0,01 utilizando o teste de Mann-Whitney. Logo, rejeitou-se a hipótese nula de que a mediana de valores de β -glucano obtidos é igual na presença ou na ausência de PpC. Observou-se que os níveis de β -glucano no soro foram significativamente superiores nos indivíduos com PpC.

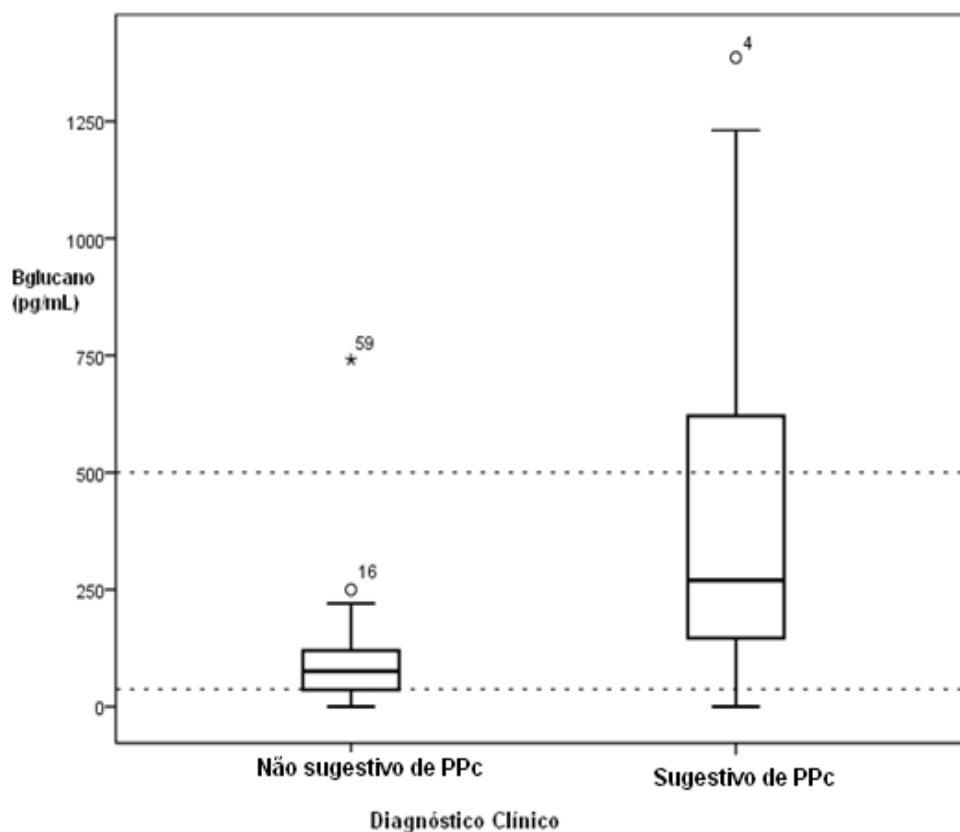


Figura 10 Gráfico da distribuição dos níveis de β -glucano obtidos nos indivíduos com e sem diagnóstico clínico sugestivo de PPc

O gráfico da figura 10 compara o diagnóstico clínico de PPc com os valores de β -glucano. Considerando esta variável obteve-se uma mediana de 270 pg/mL, no caso do diagnóstico clínico sugestivo de PPc, e uma mediana de 75,7 pg/mL no caso do diagnóstico clínico não sugestivo.

Em relação ao diagnóstico clínico, o p determinado para o teste de Mann-Whitney foi inferior a 0,05 permitindo rejeitar a hipótese nula de que o diagnóstico clínico de PPc é independente dos valores de β -glucano obtidos, ou seja, os níveis de β -glucano foram significativamente superiores nos soros dos indivíduos com diagnóstico clínico sugestivo de PPc.

Para uma análise mais correcta dos resultados procedeu-se ao estudo de quatro valores diferentes de cut-off, nomeadamente 60, 80, 100 e 300 pg/mL. O cut-off de 60 pg/mL é considerado negativo para o teste e o cut-off de 80 pg/mL é o valor definido pela técnica como positivo para infecções fúngicas (quadro 5). Ainda se consideraram,

os cut-off de 100 e 300 pg/mL uma vez que, a mediana de β -glucano obtida nos indivíduos com PPc se situa nos 314,5 pg/mL. Para cada valor de cut-off foi calculada a sensibilidade e a especificidade da técnica, isto é, a capacidade do teste identificar correctamente a doença e a capacidade do teste excluir correctamente aqueles que não possuem a doença, respectivamente. Ainda, o valor preditivo positivo, que mede a probabilidade do indivíduo ter a doença quando o teste é positivo, e o valor preditivo negativo que mede a probabilidade de não existir doença quando o teste é negativo. O quadro 8 descreve os resultados obtidos.

Quadro 8. Medidas estatísticas calculadas para os diferentes valores de cut-off.

	Cut-off			
	60 (pg/mL)	80 (pg/mL)	100 (pg/mL)	300 (pg/mL)
Sensibilidade	89,4%	89,4%	89,4%	53,2%
Especificidade	47,4%	63,2%	73,7%	100%
Valor Preditivo Positivo	80,8%	85,7%	89,4%	100%
Valor Preditivo Negativo	64,3%	70,6%	73,7%	53,7%

Os resultados obtidos para os diferentes valores de cut-off foram semelhantes ao nível da sensibilidade sendo que, apenas o cut-off de 300 pg/mL apresentou uma baixa sensibilidade de 53,2%. Em termos de especificidade e de valor preditivo positivo os resultados obtidos foram mais dispares verificando-se que, quanto maior é o valor de cut-off maior é a especificidade do teste. O cut-off de 300 pg/mL apresentou uma especificidade de 100%. Em relação ao valor preditivo negativo os melhores resultados situaram-se entre o cut-off de 80 e 100 pg/mL, com valores entre os 70 e os 75%.

No que se refere à relação entre os diferentes valores de cut-off e o diagnóstico clínico sugestivo de PPc obteve-se uma correlação de 87,8% para o cut-off de 80 pg/mL com um p igual a 0,005 utilizando o teste exacto de Fisher e, para o cut-off de 100

pg/mL uma correlação de 91,5% com um valor de ρ inferior a 0,001. Em ambos os casos rejeitou-se a hipótese nula de que, os valores de cut-off são iguais nos indivíduos com e sem diagnóstico clínico sugestivo de PPC. Em relação ao cut-off de 300 pg/mL, este apresentou uma percentagem de 96%, com um ρ igual a 0,008, utilizando o teste do χ^2 em relação à variável diagnóstico clínico. Para este valor de cut-off analisou-se ainda, a sua relação com alguns dados clínicos, nomeadamente a contagem de células T CD4⁺ inferiores a 50 células/mm³ em que se obteve uma percentagem de 68,4% com valor de ρ igual a 0,008 utilizando o teste do χ^2 . Em ambos os casos, o ρ foi inferior a 0,05 pelo que, foi possível rejeitar a hipótese nula de que, o valor mais elevado de β -glucano (300 pg/mL) e o diagnóstico clínico e alguns parâmetros de diagnóstico nomeadamente, o valor de células T CD4⁺ não estão estatisticamente relacionados.

Por fim, procedeu-se à análise dos resultados através da curva de ROC.

Geometricamente a curva de ROC é um gráfico de pares “x” e “y” que corresponde à (1-especificidade) e à sensibilidade ou a taxa de verdadeiros positivos, respectivamente num plano designado por plano ROC unitário. A designação de plano ROC unitário, deve-se ao facto das coordenadas deste gráfico representarem medidas de probabilidade e, por conseguinte, variarem entre 0 e 1. O melhor resultado corresponde a um ponto no canto superior esquerdo que corresponde a 100% da sensibilidade e 100% da especificidade, classificação perfeita. A linha diagonal traçada a verde chamada de linha de não discriminação permite dividir o espaço ROC. Os pontos acima da diagonal representam os resultados com boa classificação enquanto os pontos abaixo dessa linha representam maus resultados. A análise da curva de ROC permite, de forma directa e natural, a análise entre os custos (falsos positivos) e os benefícios (verdadeiros positivos), importante para a tomada de decisão diagnóstica.

A curva de ROC, figura 11 compara três dos cut-off estudados nomeadamente 60, 80 e 100 pg/mL com a presença ou ausência de infecção por *P. jirovecii*, sendo o cut-off de 100 pg/mL aquele que apresenta melhores resultados (ponto mais perto da classificação perfeita).

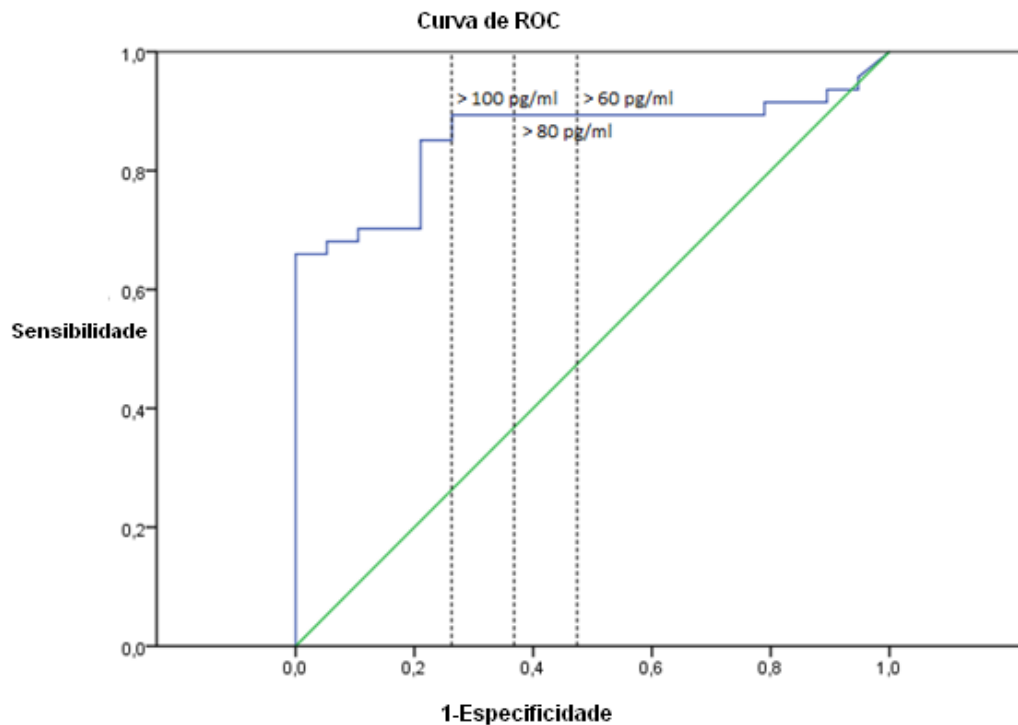


Figura 11. Curva de ROC para a presença de PPc em função de três valores de cut-off de β -glucano.

A área abaixo da curva de ROC (AUC) está associada ao poder de discriminação do teste de diagnóstico. Analiticamente, os valores da AUC podem ser analisados através de métodos estatísticos como o teste Mann-Whitney.

Na curva da figura 11, a AUC é igual a 85,7% com um intervalo de confiança de 95% (76,6% - 94,8%), isto é a probabilidade do teste classificar correctamente os indivíduos escolhidos aleatoriamente. O resultado é estatisticamente significativo p é inferior a 0,001 rejeitando-se a hipótese nula de que os resultados de β -glucano são independentes do facto dos indivíduos terem ou não PPc.

A curva da figura 12 representa os resultados obtidos para o teste do β -glucano com diferentes cut-off em relação ao diagnóstico clínico sugestivo de PPc.

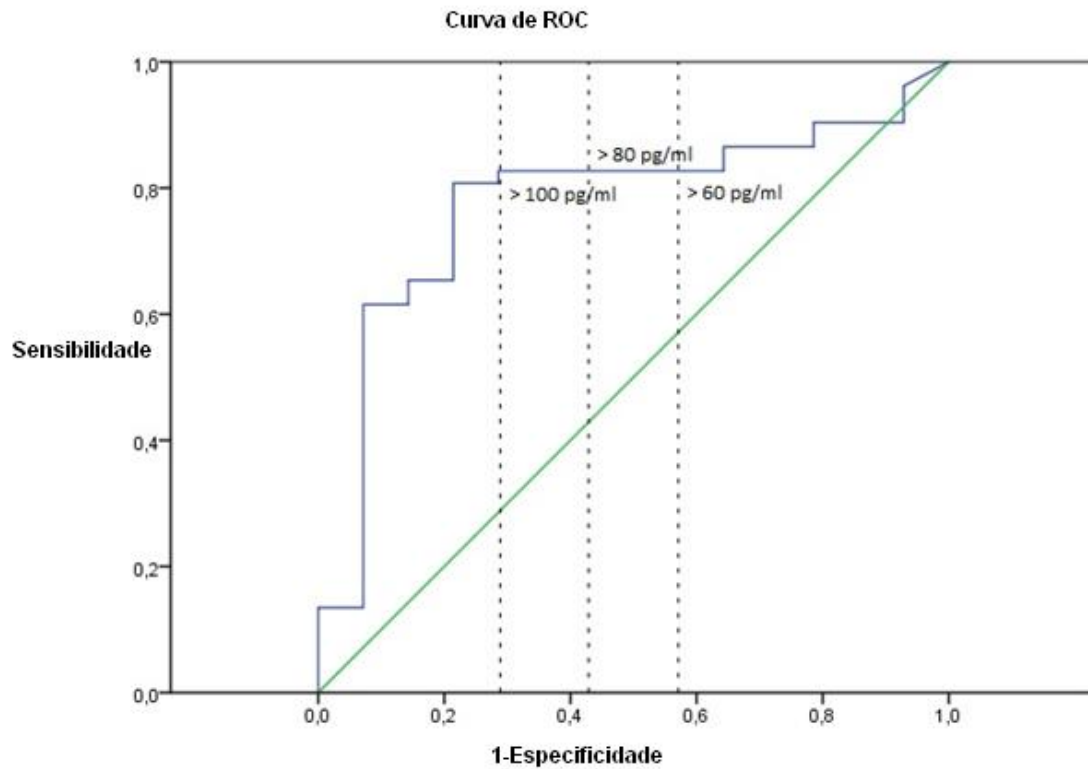


Figura 12. Curva de ROC para o diagnóstico clínico sugestivo de PPc em função de três valores de cut-off de β -glucano.

Tal como na curva anterior, os melhores resultados são os do cut-off 100 pg/mL. No entanto, em relação à AUC obtiveram-se resultados mais baixos, de 77,6% com intervalo de confiança de 95% (64,4%-90,9%), isto é, a probabilidade do teste identificar correctamente os indivíduos tendo por base apenas o diagnóstico clínico é menor. No entanto, os resultados são estatisticamente significativos com um p inferior a 0,005 (p igual a 0,002) rejeitando-se a hipótese nula de que o diagnóstico clínico é independente dos níveis de β -glucano.

3. Discussão e Conclusões

O diagnóstico definitivo de PPc implica a identificação directa de *P. jirovecii* em amostras pulmonares dos doentes, nomeadamente no LBA, a amostra habitualmente mais utilizada. O LBA é obtido através da realização de exames invasivos, que muitas vezes devido ao estado de saúde muito debilitado dos doentes não pode ser realizado, ou pode resultar no agravamento do estado de saúde. É nesta perspectiva que surge o doseamento do β -glucano no soro.

Actualmente o β -glucano é utilizado para o diagnóstico de infecções invasivas de fungos, o presente estudo tem como principal objectivo determinar a utilidade clínica do doseamento do β -glucano no soro para o diagnóstico laboratorial de PPc.

Neste estudo, verificou-se que dos 66 indivíduos com suspeita clínica de PPc, 47 confirmaram o diagnóstico e apresentaram uma mediana de β -glucano de 314,5 pg/mL enquanto, nos restantes 19 indivíduos sem diagnóstico clínico de PPc, a mediana de β -glucano foi de 63,7 pg/mL. Estatisticamente obteve-se uma forte correlação entre os níveis de β -glucano no soro e a presença de infecção por *P. jirovecii*, ρ inferior a 0,01.

No presente estudo obtiveram-se resultados compatíveis com estudos anteriores efectuados para o β -glucano, (Tasaka *et al.*, 2007 Divaret *et al.*, 2008; Del Bono *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2009 e Desmet *et al.*, 2009).

Alguns investigadores testaram o β -glucano juntamente com outros marcadores biológicos nomeadamente, Tasaka *et al.* (2007) e Nakamura *et al.* (2009) utilizaram o LDH e a glicoproteína mucina KL-6 e concluíram que o melhor marcador laboratorial para o diagnóstico de PPc era o β -glucano.

No entanto, alguns dos estudos mencionados utilizam o kit com marca comercial Fungitec G que apesar de também utilizar o lisado de amebócitos *Limulus* a espécie do qual se obteve o lisado é diferente (Fungitell[®] *Limulus polyphemus* e Fungitec G[®] *Tachypleus tridentatus*) pelo que, os estudos não podem ser comparados directamente devido à diferente reactividade para as proteínas do Factor G.

Em relação aos portadores assintomáticos, isto é, indivíduos sem sintomatologia mas em que *P. jirovecii* foi detectado através da técnica de PCR obteve-se uma mediana de 63,7 pg/mL. Os resultados obtidos são concordantes com um estudo efectuado nos

USA em que a colonização por *P. jirovecii* não causa níveis elevados de β -glucano no soro (Hillenbrand *et al.*, 2011).

Outro aspecto relevante, observado neste estudo, prende-se com o facto de se verificar que, cerca de 43 % dos indivíduos com PPc apresentaram valores de β -glucano superiores a 500 pg/mL.

Em 2009, Desmet *et al.* efectuou um estudo detalhado das amostras com valores superiores a 500 pg/mL, utilizando o teste Fungitell[®] e obteve uma mediana de 1682 pg/mL em que 84% dos doentes apresentavam valores de β -glucano superiores a 500 pg/mL. No entanto, já em 2008 Persat, *et al.* obtiveram uma percentagem de 65% de indivíduos com PPc com valores de β -glucano no soro superiores a 500 pg/mL. Quando compararam com infecções causadas por outros fungos, nomeadamente, candida verificaram uma redução substancial nos valores médios de β -glucano no soro.

Tendo em conta estudos anteriores que confirmam que a infecção por *P. jirovecii* causa níveis mais elevados de β -glucano no soro dos doentes do que a maioria dos fungos, foram estudados diferentes valores de cut-off, no sentido de verificar qual o que melhor se adequa ao diagnóstico específico da PPc. Apesar da técnica referir o valor de 80 pg/mL como resultado positivo para a generalidade dos infecções fúngicas, constatou-se que, para a infecção por *P. jirovecii* o melhor valor de cut-off são os 100 pg/mL, pois apesar da sensibilidade ser igual ao apresentado para o cut-off de 80 pg/mL (89,4%), a especificidade e o valor preditivo positivo, respectivamente 74% e 89%, melhoram significativamente. Assim, com um cut-off de 100 pg/mL a probabilidade do indivíduo ter PPc quando o teste é positivo aumenta. Verificou-se ainda que, o cut-off de 300 pg/mL apresenta uma diminuição substancial da sensibilidade e do valor preditivo negativo o que quer dizer que indivíduos com PPc e com valores de β -glucano abaixo dos 300 pg/mL serão considerados falsos negativos. Em relação à especificidade e ao valor preditivo positivo obteve-se uma percentagem de 100%, isto é, a probabilidade dos indivíduos terem a doença quando o teste é positivo é muito elevada. O teste com valores de cut-off de 300 pg/mL é um bom teste confirmatório.

Estudos anteriores utilizando o teste Fungitell[®] com um cut-off superior ou igual a 80 pg/mL, apresentaram valores de sensibilidade também de 90% mas para as restantes medidas estatísticas os valores obtidos são inferiores (Sax *et al.*, 2011).

Um estudo recente determinou como valor de cut-off para a PPc, os 85 pg/mL e obteve valores na ordem dos 90% para a sensibilidade e especificidade, apenas em relação ao valor preditivo positivo os resultados obtidos foram de apenas de 65% (Held *et al.*, 2011). Verificou-se que, utilizando um valor de cut-off mais elevado é possível aumentar o valor preditivo positivo do teste, isto é, a probabilidade do indivíduo ter PPc quando o teste é positivo, sem comprometer as restantes medidas estatísticas.

Em relação aos resultados obtidos para as variáveis, diagnóstico clínico da PPc e níveis de β -glucano verificou-se que existe uma associação estatisticamente significativa entre os valores de β -glucano e o diagnóstico clínico da PPc, com um p inferior a 0,05. No estudo dos diferentes valores de cut-off em relação ao diagnóstico clínico, os melhores resultados foram obtidos nos 100 pg/mL com uma percentagem de 92% e um valor de p inferior a 0,001. Estes resultados justificam-se pelo facto dos dados clínicos considerados para o diagnóstico clínico de PPc serem relativamente característicos de PPc principalmente em indivíduos com sistema imunitário deficitário. Neste estudo, verificou-se que, dos 52 indivíduos com diagnóstico clínico de PPc apenas sete não confirmaram o diagnóstico e os resultados obtidos com o doseamento do β -glucano são concordantes com isso.

Salienta-se assim, a importância do diagnóstico clínico no estabelecimento do diagnóstico de PPc, pelo que, níveis elevados de β -glucano, por si só, não provam a infecção por *P. jirovecii* e não devem ser interpretados sem considerar as evidências clínicas.

Outro objectivo deste trabalho prendia-se com a utilização do β -glucano como indicador quantitativo de infecção, útil não só no diagnóstico da primo-infecção como, também, na monitorização do tratamento e prognóstico da doença.

No presente estudo foi possível verificar que quanto maior o número de quistos de *P. jirovecii* nas secreções pulmonares, mais elevados são os níveis de β -glucano detectados no soro dos doentes.

Em relação à evolução clínica verificou-se que, os níveis de β -glucano são inferiores nos indivíduos com evolução clínica positiva no entanto, estes resultados são preliminares devido ao reduzido número de amostras e de informação disponível. Da literatura consultada, os resultados obtidos são contraditórios.

Estudos efectuados em 2005 e 2006 apontaram para uma correlação entre um mau prognóstico e níveis elevados de β -glucano no soro (Shimizu *et al.*, 2005 & Ikuni *et al.*, 2006). Enquanto estudos posteriores demonstraram não existir uma diferença significativa entre os valores de β -glucano e o bom ou mau prognóstico da doença (Nakamura *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009 ; Held *et al.*, 2011).

Em virtude dos resultados obtidos e tendo em conta o potencial do teste do β -glucano para o diagnóstico de PPc pretende-se, num futuro próximo, realizar estudos com um maior número de amostras para o cut-off definido, no sentido de determinar um cut-off específico para o diagnóstico desta doença através da detecção do β -glucano e ainda, determinar a real utilidade clínica deste teste na monitorização e prognóstico de PPc.

5. Referências bibliográficas

Abouya, Y., Beaumel, A., & Lucas, S. (1992). *Pneumocystis carinii* pneumonia. An uncommon cause of death in African patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 145, 3 , 617-620.

Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., & Saito, H. (1993). Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-β-D-glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformation. *J Biochem*, 113 , 683-686.

Aliouat-Denis, C. A., Martinez, A., Aliouat, E. M., Pottier, M., Gantois, N., & Dei-Cas, E. (2009). The *Pneumocystis* life cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 3 , 419-426.

Aliouat-Denis, C., Chabé, M., Demanche, C., Aliouat, E., Viscogliosi, E., Guillot, J., *et al.* (2008). *Pneumocystis* species, coevolution and pathogenic power. *Infect Genet Evol*, 8 , 708-726.

Anuradha, S. (2007). Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infection in an AIDS patient: a case report. *Acta Cytol*, 51 , 599-601.

Baughman, R. P., Dohn, M., & Frame, P. (1991). Generalised immune response to *Pneumocystis carinii* infection in the lungs. *Journal of Protozoology*, 38 , 187-188.

Beck, J., & Cushion, M. (2009). *Pneumocystis* workshop: 10th Anniversary Summary. *Eukaryotic cell* , 446-460.

Beck, J., & Harmsen, A. (1998). Lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii*. *Semin Respir Infect*, 13 , 330-338.

Beck, J., Liggitt, H., Brunette, E., Fuchs, H., Shellito, J., & Debs, R. (1991). Reduction in intensity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice by aerosol administration of gamma interferon. *Infect Immun*, 59 , 3859-3862.

Bigby, T. (1994). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. How invasive?. *Chest* 10, 3 , 650-652.

Bigby, T., Margolskee, D., & Curtis, J. (1986). The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 133, 4 , 515-518.

Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Dillen, P. M., & Noordaa, J. V. (1990). Rapid and Simple method for purification of nucleic acids . *Journal of Clinical Microbiology*, 28 , 495-503.

Broaddus, C., Dake, M., & Stulbarg, M. (1985). Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 102, 6 , 747-752.

Centers For Disease Control and Prevention (CDC), (1980). *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Los Angeles MM. W.R.* 30 , 507.

Chagas, C. (1909). Trabalho do Instituto Manguinhos sobre uma nova trypanosomiase humana. *Ann Acad Med Rio de Janeiro*, 75 , 188-190.

Cornillot, E., Keller, B., Cushion, M., Méténier, G., & Vivarès, C. (2002). Fine analysis of the *Pneumocystis carinii f. sp. carinii* genome by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis. *Gene*, 293 , 87-95.

Costa, M. C., Gaspar, J., Mansinho, K., Esteves, F., Antunes, F., & Matos, O. (2005). Detection of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Scard Jour Infect Diseases*, 37 , 766-771.

Cushion, M. (2004). *Pneumocystis*: unraveling the cloak of obscurity. *Trends Microbiol*, 12 , 243-249.

Cushion, M. T., Ashbaugh, A. D., Collins, M. S., & Walzer, P. D. (2008). In vivo efficacy of echinocandins in a mouse model of *Pneumocystis murina* pneumonia. *10th Int. Workshops Opportunistic Protists*, (pp. 28-30). Boston.

Da Silva, R., Bazzo, M., & Borges, A. (2007). Induced Sputum versus Bronchoalveolar Lavage in the Diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11 , 549-553.

De Souza, W., & Benchimol, M. (2005). Basic Biology of *Pnemocystis carinii* - A mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 , 903-908.

- De Stefano, J. A., Myers, J., Du Pont, D., Foy, J. M., Theus, S. A., & Walzer, P. D. (1998). Cell Wall Antingens of *Pneumocystis carinii* Trophozoites and Cysts: Purification and Carbohydrates Analysis of these Glycoproteins. *J Eukaryot Microbiol*, 45 , 334-343.
- Dei-Cas, E. (2000). *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Med Mycol*, 38 , 23-32.
- Dei-Cas, E., Aliouat, E., & Cailliez, J. (2004). Cellular structure. In: *Pneumocystis pneumonia*, 3rd ed, Walzer , P. D. (Ed). New York: Marcel Dekker Inc, pp. 61-94.
- Dei-Cas, E., Soulez, B., & Camus, D. (1989). Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explants cultures of rabbit lung and cultures with or without feeder cells. *J Protozool*, 36 , 55-57.
- Del Bono, V., Mularoni, A., Furfaro, E., Delfino, E., Rosasco, L., Miletich, F., et al. (2009). Clinical evaluation of (1→3)-β-glucan assay in presumptive *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clin Vacc Immunol*, 16 , 1524-1526.
- Delanoe, P., & Delanoe, M. (1912). Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec *Trypanosoma lewisi*. *Acad Sci*, 155 , 658-660.
- Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbokon, E., De Muntor, P., et al. (2009). Serum (1→3)-β-D-glucan as a tool for Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection or Hematological Malignancy. *J Clin Microbiol*, 47 , 3781-3784.
- Divaret, D., Magnc, D., Angoulvant, A., & Roux, P. (2008). Usefulness of serum (1→3)-β-glucan assay for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia diagnosis. *International Workshop on Oportunistic Protists* (p. Abstrat P017). Boston: MA.
- Edman, J., Kovacs, J., Masur, H., Santi, D., Elwood, H., & Sogin, M. (1988). Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334 , 519-522.
- Elvin, K. (1994). Laboratory diagnosis and ocorrence of *Pneumocystis carinii*. *Scandin J Infect Dis Suppl*, 94 , 1-34.

Fannin, S., Gottlieb, M., & Weisman, J. (1982). "A Cluster of Kaposi's Sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Range Counties, California". *MMWR Weekly*, 31 , 305–307.

Finkelman, M. A. (2010). *Pneumocystis jirovecii* infection: cell wall (1→3)- β -D-glucan biology and diagnostic utility. *Clin Rev Microb* , 1-11.

Finkelman, M. A., & Tamura, H. (2007). Detection and measurement of (1→3) β -glucan with *Limulus* Amebocyte Lysate-based reagents. *Toxicology of 1-3 Beta-glucans ed. SH Young* .

Gosey, L., Howard, R. M., Witebsky, F., Ognibene, F. P., Wu, T. C., Gill, V. J., *et al.* (1985). Advantages of modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 803-807.

Guimarães, R. C., & Cabral, J. A. (1997). *Estatística*. Portugal: McGraw-Hill.

Haidaris, P., Wrigh, T., Gigliotti, F., Fallon, M., Whitbeck, A., & Haidaris, C. (1993). In situ hybridization analysis of developmental stages of *Pneumocystis carinii* that are transcriptionally active for a major glycoprotein gene. *Mol Microbiology*, 7 , 47-56.

Held, J., Kosh, M., Reischl, U., Danner, T., & Serr, A. (2011). Serum (1→3)- β -glucan measurement as early indicator for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value . *Clin Microbiol and Infect* , 595-602.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J., Blackwell, M., Cannon, P., Eriksson, O., *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res*, 111 , 509-547.

Hillenbrand, M. E., Lucht, L., Finkelman, M., Singh, V., Kessinger, C. J., Oleksiuk, M. P., *et al.* (2011). Levels of (1→3)- β -D-glucan in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *American Thoracic Society* (p. Abstrat P4141). Pittsburgh.

Hughes, W. (1982). Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis*, 145 , 842-848.

- Iikuni, N., Kitahana, M., Ohta, S., Okamoto, H., Kamatani, N., & Nishinarita, M. (2006). Evaluation of *Pneumocystis* pneumonia infection risk factors in patients with connective tissue disease. *Mod Rheumatol*, 23 , 282-288.
- Itatani, C. (1996). Ultrastructural demonstration of intermediate forms and forms suggestive of conjugation in the life cycle of *Pneumocystis carinii*. *J Parasitol*, 82 , 163-171.
- Iwanaga, S. (1993). The *limulus* clotting reaction. *Curr Opin Immunol*, 5 , 74-82.
- Ketchum, M. A., Finkelman, M. A., Rex, J. H., & Ostrosky-Zeichner, L. (2004). (1→3)-β-D-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections. *Clin Infect Dis*, 39 , 199–205.
- Koo, S., Bryar, J. M., Page, J. H., Baden, L. R., & Maty, F. M. (2009). Diagnostic performance of the (1→3)-β-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Inf Dis*, 49 , 1650-1659.
- Kottom, T., & Limpert, A. H. (2000). Cell Wall Assembly by *Pneumocystis carinii*. *Journal of Biological Chemistry*, 51 , 40628-40634.
- Koziel, H., Eichbaum, Q., & Kruskal, B. A. (1998). Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation. *J Clin Invest*, 102 , 1332-1344.
- Limper, A. H., Hoyte, J. S., & Standing, J. E. (1997). The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung . *J Clin Invest*, 99 , 2110-2117.
- Limper, A., Offord, K., Smith, T., & Martin, W. (1989). *Pneumocystis carinii* pneumonia: differences in lungs parasite inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis*, 140 , 1204-9.
- Masur, H., Kaplan, J., & Holmes, K. (2002). Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons - 2002: recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *Ann Intern Med*, 137 , 435-478.

Matos, O., Azevedo, P., Caldeira, L., Mendes, A., Araújo, A. T., Forte, M., *et al.* (1995). Estudo Comparativo de três métodos morfológicos da pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PPC) em infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH). *Rev Port Doen Infect*, 18 , 135-138.

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

Meuwissen, J., Tauber, I., & Leeuwenberg, A. (1977). Parasitologic and serologic observations of infection. *J Infect Dis*, 136 , 43-49.

Miller, R., Kocjan, G., Buckland, J., Holton, J., Malin, A., & Semple, S. (1991). Sputum induction for the diagnosis of pulmonary disease in HIV patients. *The Journal of Infection*, 23 , 5-15.

Mills, J. (1986). *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* infection in patients with AIDS. *Rev Infect Dis*, 8 , 1001-1011.

Mitsutake, K., Miyasaki, T., Tashiro, T., Yamamoto, Y., Takeya, H., Otsubo, T., *et al.* (1996). Endolase antigen, mannan antigen, Can-Tec antigen, and β -D-glucan in patients with candidemia. *J. Clin Microbiol*, 34 , 1918-1921.

Miyazaki, T., Kohno, S., Mitsutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K., & Ishikawa, N. (1995). Plasma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis and cryptococcosis. *J Clin Microbiology*, 33 , 3115-3118.

Montes-Cano, M., Chabe, M., Fontillon-Alberdi, M. D., Friaiza, V., Morilla, R., Gantois, N., *et al.* (2008). Molecular evidence of *Pneumocystis jirovecii* transplacental transmission in humans. *10th Int Workshops Opportunistic Protists*, (p. abstr PO41). Boston.

Morris, A. (2004). "Current Epidemiology of *Pneumocystis Pneumonia*". *Emerg Infect Dis* 10 , 1713–1720.

Murray, J. (2005). Pulmonary complications of HIV-1 infection among adults living in Sub-Saharan Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*, 9 , 826-835.

Nakamura, H., Tateyama, M., Tasato, D., Haranaga, S., Yara, S., Higa, F., et al. (2009). Clinical Utility of Serum β -D-Glucan and KL-6 Levels in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Inter Med*, 48 , 195-202.

Ng, V., Yajko, D., & Hadley, W. (1997). Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev* 10 , 401-418.

Nollstadt, K. H., Powles, M. A., Fujioka, H., Aikawa, M., & Schmatz, D. M. (1994). Use of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan specific antibody to study the cyst wall of *Pneumocystis* and the effects of pneumocandin B. *Antimicrob Agents Chemother* , 28, 2258-2265.

Ortona, E., Margutti, P., & De Luca, A. (1996). Non specific PCR products using rat-derived *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene-specific primers in DNA amplification of human respiratory samples. *Mol Cell Probes*, 10 , 187-190.

Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B., Kett, D. H., Vazquez, J., & Pappas, P. G. (2005). Multicenter clinical evaluation of the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay as a aid to the diagnosis of fungal infection in humans. *Clin Infect Dis*, 41 , 654–659.

Persat, F., Ranque, S., Derouin, F., Michel-Nguyen, A., & Picot, S. (2008). Contribution of the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infection. *J. Clin. Microbiol*, 46 , 1009–1013.

Phair, J., Muñoz, A., & Detels, R. (1990). The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*, 322 , 161-165.

Pickering, W. J., Sant, W. H., Bowles, A. P., & Roberts, L. W. (2005). Evaluation of a (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infection. *Journal of Clinical Microbiology* , 5975-5962.

Ponce, C. A., Gallo, M., Bustamante, R., & Vargas, S. L. (2010). *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis*, 50 , 347-353.

Puzio, J., Kucewicz, E., & Sioła, M. (2009). Atypical and opportunistic pulmonary infections after cardiac surgery. *Anestezjologia Intensywna Terapia*, 41 , 41-45.

- Quist, J., & Hill, A. (1995). Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. *Chest*, *108*, 415-418.
- Rani, N., Reddy, V., Kumar, A., Kumar, K., Babu, G., & Rao, D. (2000). Clinical Profile of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in HIV infected persons. *Ind J Tub* *47*, 93-96.
- Roths, F., Sidman, C. (1992). Both immunity and hyperresponsiveness to *Pneumocystis carinii* result from transfer of CD4 but not CD8 T cells in severe combined immunodeficient mice. *J Clin Invest*, *90*, 673-678.
- Roths, J., Marshall, J., Allen, R., Carlson, G., & Sidman, C. (1990). Spontaneous *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunodeficient mutant scid mice: natural history and pathobiology. *Am J Pathol*, *136*, 1173-1186.
- Ryan, K., & Ray, C. (2004). *Sherrie Medical Microbiology (4th ed)*. McGraw Hill.
- Safrin, S., Finkelstein, D., & Feinberg, J. (1996). Comparison of three regimens for treatment of mild to moderate *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. A double-blind, randomized, trial of oral trimethoprim-sulfamethoxazole, dapsone-trimethoprim, and clindamycin-primaquine. *Ann Intern Med*, *124*, 792-802.
- Sax, P. E., Finkelman, M. A., Grant, P., Andersen, J., & Zolopa, A. R. (2011). (1→3)- β -glucan is a Promising Non-invasive Diagnostic Test for HIV-related *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Clin Infect Dis*, *53*, 197-202.
- Schmatz, D. M., Powles, M. A., McFadden, D., Nollstadt, K., Bouffard, F. A., Dropinski, J. F., et al. (1995). New semisynthetic pneumocandins with improved efficacies against *Pneumocystis carinii* in the rats. *Antimicrob. Agents Chemother*, *39*, 1320-1323.
- Sepkowitz, K., Brown, A., Telzak, E., Gottlieb, S., & Armstrong, D. (1992). *Pneumocystis carinii* pneumonia among patients without AIDS at a cancer hospital. *JAMA*, *267*, 832-837.
- Sexton, A., & Howlett, B. (2006). Parallels in fungal pathogenesis on plants and animal hosts. *Eukaryot Cell*, *5*, 1941-1949.

- Shellito, J., Suzara, V., Bluemenfeld, W., Becj, J., Steger, H., & Hermak, T. (1990). A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T-lymphocyte. *J Clin Invest*, 85 , 1686-1693.
- Shimizu, A., Oka, H., Matsuda, T., & Ozaki, S. (2005). (1→3)-β-D-glucan is a diagnostic and negative prognostic marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* , 678-680.
- Stringer, J., Beard, C., Miller, R., & Wakefield, A. (2002). A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis*, 891-896.
- Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, s., Yoshida, M., Obayashi, T., & Kawai, T. (1994). Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-β-D-glucan in human blood. *Clin Chim Acta*, 226 , 109-112.
- Tasaka, S., Hasegawa, N., & Kobayashi, S. (2007). Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest*, 131 , 1173-1180.
- Thomas, C. F., & Limper, A. H. (2004). *Pneumocystis* Pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, 350 , 2487-98.
- Vassallo, R., Standing, J., & Limper, A. (2000). Isolated *Pneumocystis carinii* cell wall glucan provokes lower respiratory tract inflammatory. *J Immunol*, 164 , 3755-3763.
- Wakefield, A. E. (1996). DNA sequenc identical to *Pneumocystis carinii f. sp carinii* and *Pneumocystis carinii f. hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol*, 34 , 1754-1759.
- Wakefield, A. (1995). Re-examination of epidemiological. In: *Baillieére's Clinical Infectious Diseases, International Practice and Research*, Sattler, F. R., Walzer, P. D. (Eds). London: Baillière´s Tindall, W. B. Saunders, pp. 431-438.
- Wakefield, A., Pixley, F., Banerji, S., Miller, R., Moxon, E., & Hopkin, J. (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with amplification. *Lancet*, 336 , 451-453.
- Walzer, P. (2002). Infecção por *Pneumocystis carinii* In: *Medicina Interna, 15ª edição, Harrison, T. (Ed)*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, pp. 1253-1255.

- Walzer, P., Pearl, D., Krogstan, D. J., Rawson, P. G., & Schultz, M. G. (1974). *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States: epidemiology, diagnostics and clinical features. *Ann Intern Med*, 80 , 83-93.
- Walzer, P., Schnelle, V., Armstrong, D., & Rosen, P. (1977). Nude mouse: a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. *Science*, 197 , 177-179.
- Watanabe, T., Yasuoka, A., Tanuma, J., Yazaki, H., Honda, H., Tsukda, K., et al. (2009). Serum (1→3)-β-D-glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*, 48 , 1128-1131.
- Wright, T., Gigliotti, F., Finkelstein, J., McBride, J., An, C., & Harmsen, A. (1999). Immunemediated inflammation directly impairs pulmonary contributing to the pathogenesis. *J Clin Invest*, 104 , 1307-1317.
- Wyder, M., Rasch, E., & Kaneshiro, E. (1998). Quantification of absolute *Pneumocystis carinii* nuclear DNA content: trophic ad cystic forms isolate from infected rat lungs are haploid organisms. *J Eukaryot Microbiol* , 45, 233-9.
- Yale, S., & Limper, A. (1996). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc*, 71 , 5-13.
- Yasuoka, A., Tachikawa, N., Shimada, K., Kimura, S., & Oka, S. (1996). (1→3)-β-D-glucan as a quantitative serological marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3 , 197-199.