



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Novas abordagens de diagnóstico da pneumonia por**  
***Pneumocystis jirovecii* (PPc): potencial diagnóstico dos**  
**anticorpos IgA específicos na saliva**

**Autor:** Ana Cláudia da Graça Cardita

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de  
Mestrado em Ciências Biomédicas

**JANEIRO, 2019**





DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Novas abordagens de diagnóstico da pneumonia por  
*Pneumocystis jirovecii* (PPc): potencial diagnóstico dos  
anticorpos IgA específicos na saliva**

**Autor:** Ana Cláudia da Graça Cardita

**Orientador:** Professora Doutora Olga Matos

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre no ramo das Ciências Biomédicas, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos.

**JANEIRO, 2019**



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar pretendo agradecer à minha família porque me vincularam sempre ao lema de “*Querer é poder*” e porque me têm acompanhado desde sempre. Muito obrigada.

Às minhas estrelas que já não estão fisicamente comigo, mas presentes em tudo o que faço. Amar-vos-ei sempre.

À minha orientadora, Professora Doutora Olga Matos, agradeço a sua constante disponibilidade, preocupação e conhecimentos transmitidos. E por me ter transmitido o mais importante: quando queremos algo, trabalhamos. Quando queremos muito alguma coisa, trabalhamos ainda mais.

À Doutoranda Ana Tomás o meu apreço e profundo agradecimento por ter acompanhado todo o meu percurso, nos bons e menos bons momentos. Pela disponibilidade. Pela amizade. Por tudo.

Ao grupo de protozoários oportunistas/ VIH e outros protozoários do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, agradeço o acolhimento e disponibilidade para a realização do meu trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Luísa Martins e Dr. Fernando Cardoso pela ajuda disponibilizada nesta caminhada. Obrigada por animarem sempre os meus dias.

A todo serviço de pneumologia e sala de técnicas do Hospital de Egas Moniz, porque sem a sua colaboração seria impossível. O meu agradecimento particular ao Dr. José Manuel Correia, Dr. Fernando Nogueira, Dr.<sup>a</sup> Rafaela Campanha, Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Vieira, Dr.<sup>a</sup> Joana Ferra, Dr.<sup>a</sup> Joana Carvalho, Dr.<sup>a</sup> Inês Oliveira, Enfermeira Cátia Santos e Enfermeira Mafalda Pinto. Não esquecendo também a minha Chefe Isabel Simões e Subchefe Catarina Simão.

## Agradecimentos

Aos meus colegas e amigos, Lília Góia Costa, Micael Almeida, Rita Martins, Ionela Toader pelo companheirismo, amizade e partilha de noites a estudar.

Às minhas amigas Sofia Loução, Ana Lima, Vanda Bento, Phillipe Fernandes e Rita Valente pelos turnos da noite em que as campainhas tocavam e vocês iam em meu lugar para poder estudar um pouco mais. Não tenho palavras.

Aos meus amigos de sempre: André Sintra agradeço-te a paciência, entrega e presença de corpo e alma. Noites de estudo que jamais esquecerei; Pedro Ogando dos Santos agradeço-te a entrega sempre e por acreditares sempre em mim, mesmo nos dias em que já nem eu acreditava.

Ao João Esteves, meu namorado, pelo apoio incondicional, pelo amor, pela força e incentivo, por tudo. Obrigada por seres a representação da perseverança, paz e nunca me deixares desistir de nada.

## **DEDICATÓRIA**

Dedicado à saúde.

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho." Dalai Lama



## RESUMO

*Pneumocystis jirovecii* é um fungo com alta variabilidade genética, com tropismo e especificidade para o pulmão humano e capaz de provocar pneumonia intersticial severa em indivíduos imunocomprometidos. Tendo em conta que o diagnóstico laboratorial da pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) depende da obtenção de espécimes respiratórios maioritariamente obtidos de forma invasiva e da visualização do microrganismo mediante técnicas morosas e onerosas, torna-se necessário explorar novas abordagens. Assim, é premente a obtenção de uma técnica de diagnóstico mais rápida e menos dispendiosa do que as existentes e que utilize amostras biológicas de obtenção pouco ou não invasiva.

A IgA secretória é uma imunoglobulina que existe nas secreções nomeadamente na saliva, lágrimas e mucosas. Assim, a pesquisa de IgA anti-*P. jirovecii* em saliva, parece ser uma abordagem promissora no desenvolvimento de métodos de diagnóstico não invasivos da PPc. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os níveis de IgA anti-*P. jirovecii* presentes na saliva de doentes com PPc e em doentes com outras patologias pulmonares, recorrendo a um antigénio recombinante sintético (ARS) de *P. jirovecii* previamente desenhado como ferramenta antigénica pelo grupo de investigação em Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, e aplicá-lo no desenvolvimento de uma plataforma imunoenzimática de diagnóstico da PPc.

Para tal, no presente estudo foram colhidas secreções brônquicas e saliva de 85 doentes adultos com patologia pulmonar, que recorreram aos serviços do Hospital Egas Moniz para execução de broncofibroscopia, entre os meses de fevereiro e julho de 2018. Todos os doentes participantes assinaram um consentimento informado. As secreções brônquicas foram utilizadas para efetuar o diagnóstico laboratorial padrão da PPc, por imunofluorescência com anticorpos monoclonais e *nested*-PCR, e para categorizar os doentes em três categorias distintas: doentes com PPc, doentes com infeção assintomática por *P. jirovecii* (colonizados) e doentes sem infeção por *P. jirovecii*.

Verificou-se que somente 4,8% da população analisada correspondia a doentes com PPc (infeção sintomática) e que não existia uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de IgA anti-*P. jirovecii* detetados nos doentes com PPc comparativamente a doentes colonizados (assintomáticos) por *P. jirovecii* ( $p=0.593$ ) ou doentes sem infeção por *P. jirovecii* ( $p=0,494$ ), com a técnica ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) desenvolvida. Contudo, os títulos médios de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* detetados na saliva de doentes com infeção por *P. jirovecii* foi superior ao detetado nos doentes sem infeção por *P. jirovecii*. Assim, considerando o benefício que trará para o doente e para o controlo clínico desta doença a possibilidade de utilização deste tipo de amostras para diagnóstico da PPc, um novo estudo com uma amostragem mais equilibrada entre as categorias de doentes deve ser feito, por forma a se reavaliar a aplicabilidade das IgA secretórias no diagnóstico desta patologia.

**Palavras-chave:** *Pneumocystis jirovecii*, IgA secretória, saliva



## ABSTRACT

*Pneumocystis jirovecii* is a fungus with high-genetic variability, tropism and specificity for the human lungs, able to cause interstitial pneumonia (PcP) in immunocompromised patients. Actually, the diagnose of PcP requires the collection of invasive biological specimens and the visualization of the microorganism through time-consuming and costly techniques. Therefore, new approaches for PPc diagnosis should be developed to reduce the overall cost and time, and to use non-invasive biological specimens.

IHTM's investigation group on Opportunistic Protozoa/HIV and Other Protozoa has developed a synthetic recombinant antigen (SRA) specific for *P. jirovecii*, able to detect, with good specificity and sensitivity, IgM and IgG anti-*P. jirovecii* antibodies in serum specimens. Based in these preliminary results, the group decided to assess the use of this SRA as antigenic tool to detect IgA anti-*P. jirovecii* in saliva specimens.

The IgA it's an immunoglobulin that exists in bodily secretions such as saliva, tears, and mucus, making this specimen very attractive for non-invasive diagnosis of PcP.

The aims of this thesis consisted on the evaluation of the IgA anti-*P. jirovecii* levels in saliva from patients with PcP and patients with other pulmonary disorders, using the SRA produced previously as an antigenic tool, and the development of an immunoenzymatic platform for the diagnosis of PPc.

In this study, bronchial secretions and saliva specimens were collected from 85 adult patients with pulmonary disorders, who performed bronchofibroscopy at Egas Moniz Hospital between February and July 2018. All participants signed an informed consent. All bronchial secretions were used to perform the standard laboratory diagnosis of PcP, by immunofluorescence with monoclonal antibodies (IFI) and nested-PCR, and to categorize patients into three distinct categories: patients with PPc, patients with asymptomatic infection by *P. jirovecii* (carriers) and patients without *P. jirovecii* infection.

Only 4.8% of the analysed population had PcP (symptomatic) and no significant difference was observed between the levels of IgA anti-*P. jirovecii* across patients in each of the three groups ( $p=0.593$  for comparison between patients with PcP and carriers;  $p=0.494$  for comparison between patients with PcP and patients without *P. jirovecii* infection) with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) developed.

However, the average levels of IgA anti-*P. jirovecii* detected on patients with *P. jirovecii* infection were higher than those detected in patients not infected by *P. jirovecii*. Therefore, it is suggested that a new study should be carried out, using more balanced sampling methods across the different categories of patients, in order to reassess the applicability of secretory IgA in the diagnosis of PcP.

**Keywords:** *Pneumocystis jirovecii*, secretory IgA, saliva



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**%** – Percentagem

**°C** – Graus Celsius

**μL** – Microlitro

**μm** - micrómetro

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)

**ARS** – Antígeno recombinante sintético

**BSA** – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

**CDC** – Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*)

**CHLO** – Centro Hospitalar Lisboa Ocidental

**DHFR** – Di-hidrofolato redutase

**DTT** – Ditioneitol

**EI** – Expetoração induzida

**ELISA** – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**EUA** – Estados Unidos da América

**HEM** – Hospital de Egas Moniz

**IFI** – Imunofluorescência indireta

**IFI/AcM** – Imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais

**IgA** – Imunoglobulina A

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IHMT** – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**INF-γ** – Interferão gama

**LBA** – Lavado broncoalveolar

**LDH** – Lactato desidrogenase (do inglês, *Lactate dehydrogenase*)

**M** – Molar (mole/L)

**mg** – Miligrama

**mL** – Mililitro

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

**mm** – Milímetro

**mmHg** – Milímetro de mercúrio

**Msg** – Glicoproteína major de superfície (do inglês, *Major surface glycoprotein*)

**mtLSUrRNA** – Subunidade grande do RNA ribossômico mitocondrial (do inglês, *Mitochondrial Large Subunit ribosomal RNA*)

*p* – Valor da estatística de teste

**PaO<sub>2</sub>** – Pressão parcial de oxigénio arterial

**Pb** – pares de bases

**PBS** – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

**PBS-T** – Tampão fosfato salino suplementado com detergente Tween

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

**PPc** – Pneumonia por *Pneumocystis*

**PVA** – Álcool polivinílico (do inglês, *Polyvinyl Alcohol*)

**rpm** – Rotações por minuto

**rRNA** – RNA ribossômico (do inglês, *ribosomal ribonucleic acid*)

**SB** – Secreções brônquicas

**Sida** - Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

**SNS** – Sistema Nervoso Central

**SPSS** – Programa informático de análise estatística (do inglês, *statistical package for social sciences*)

**T CD4<sup>+</sup>** – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 4 (do inglês, *cluster of differentiation 4*).

**T CD8<sup>+</sup>** – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 8 (do inglês, *cluster of differentiation 8*).

**TARVc** – Terapia anti retrovívica combinada

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alfa*)

**U** – Unidades

**UNL** – Universidade Nova de Lisboa

**VIH** – Vírus da Imunodeficiência Humana

$\chi^2$  – Teste do Chi-quadrado

## ÍNDICE DE CONTEÚDOS

FOLHA DE ROSTO.....	i
AGRADECIMENTOS .....	iii
DEDICATÓRIA .....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	xi
ÍNDICE DE CONTEÚDOS .....	xiii
LISTA DE QUADROS .....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
1.1 Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> ou Pneumocistose (PPc).....	1
1.2 Morfologia e ciclo de vida.....	3
1.3 Epidemiologia.....	7
1.4 Fisiopatologia da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	9
1.4.1 Modo de transmissão da PPc .....	9
1.4.2 Alterações alveolares e resposta imunológica .....	10
1.5 Abordagem clínica e terapêutica.....	13
1.6 Diagnóstico da PPc .....	16
1.6.1 Novas abordagens de diagnóstico.....	17
2. OBJETIVOS .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1 Resumo da sequência/etapas do projeto .....	23
3.2 Recolha de amostras biológicas .....	24
3.2.1 Ficha de Dados Clínicos .....	24
3.2.2 Colheita de saliva - <i>Kit salivette</i> .....	24
3.2.3 Colheita de secreções brônquicas .....	25
3.2.4 Colheita de sangue periférico .....	26
3.3 Processamento das amostras biológicas.....	27
3.3.1 Secreções brônquicas.....	27
3.3.2 Saliva .....	27
3.3.3 Sangue.....	28
3.4 Diagnóstico laboratorial da PPc.....	29

## Índice de Conteúdos

3.4.1	Deteção de <i>Pneumocystis jirovecii</i> em espécimes pulmonares por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM).....	29
3.4.2	Amplificação do gene mtLSUrRNA de <i>P. jirovecii</i> por <i>nested</i> -PCR.....	30
3.5	ELISA para deteção de anticorpos IgA anti- <i>P. jirovecii</i> em amostras de saliva .....	31
3.5.1	Antigénio recombinante sintético da glicoproteína major de superfície (Msg) de <i>P. jirovecii</i> .....	31
3.5.2	Protocolo do teste ELISA desenvolvido para deteção de IgA anti- <i>P. jirovecii</i> na saliva .....	31
3.6	Análise de Dados .....	33
4.	RESULTADOS .....	35
4.1	Caraterização da amostragem .....	35
4.2	Deteção de <i>Pneumocystis jirovecii</i> em espécimes pulmonares (secreções brônquicas) por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI-AcM) .....	38
4.3	Amplificação do gene mtLSUrRNA de <i>P. jirovecii</i> por <i>nested</i> -PCR.....	40
4.4	ELISA para deteção de anticorpos IgA anti- <i>P. jirovecii</i> em amostras de saliva .....	41
4.5	Análise estatística dos dados obtidos.....	43
5.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	45
6.	BIBLIOGRAFIA .....	51
7.	ANEXOS .....	57
I.	Consentimento Informado .....	57
II.	Aprovação da Comissão de Ética do CHLO para a Saúde .....	61
III.	Aprovação da Comissão Nacional de Proteção de Dados .....	63
IV.	Aprovação da Comissão de Ética do IHMT .....	67
V.	Ficha de Dados Clínicos .....	69

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Condições térmicas utilizadas na realização da <i>nested</i> -PCR para amplificação específica do gene mtLSUrRNA de <i>P. jirovecii</i> .....	30
Quadro 2. Dados laboratoriais e parâmetros clínicos dos 83 doentes em estudo .....	36
Quadro 3. Diagnóstico definitivo da PPc em função do género .....	37



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Pneumocystis jirovecii</i> com reprodução assexuada e sexuada.....	4
Figura 2. Representação esquemática das principais estruturas da forma quística de uma célula de <i>P. jirovecii</i> .....	6
Figura 3. Rx tórax de doente com pneumonia por <i>P. jirovecii</i> .....	14
Figura 4. Agrupamentos de formas quísticas de <i>P. jirovecii</i> coradas por imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti- <i>P. jirovecii</i> em secreções brônquicas de um doente em estudo, com ampliação de 400x.....	38
Figura 5. Agrupamento de formas quísticas de <i>P. jirovecii</i> coradas por imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti- <i>P. jirovecii</i> em secreções brônquicas de um doente em estudo, com ampliação de 1000x.....	39
Figura 6. Gel de PCR de seis amostras de doentes (1-6), dois controlos positivos, um controlo negativo e um marcador de peso molecular de 100 pb.....	40
Figura 7. Ilustração do fundamento da técnica de ELISA para deteção de anticorpos da classe IgA anti- <i>P. jirovecii</i> . .....	42
Figura 8. Representação de uma placa de ELISA com estudo de três amostras, em duplicado, em poços teste e poços controlo. ....	42
Figura 9. Diagrama de extremos e quartis com representação dos valores dos testes ELISA para deteção de anticorpos IgA anti- <i>P. jirovecii</i> , obtidos nas categorias de doentes com PPc, doentes sem PPc e doentes colonizados .....	43
Figura 10. Diagrama de extremos e quartis com representação dos valores dos testes ELISA para deteção de anticorpos IgA anti- <i>P. jirovecii</i> contrastando as categorias de doentes sem infeção por <i>P. jirovecii</i> e os doentes com infeção por <i>P. jirovecii</i> .....	44



# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* ou Pneumocistose (PPc)

*Pneumocystis jirovecii* é um microrganismo oportunista que foi descoberto em 1909 por Carlos Chagas no Brasil, quando observava ao microscópio uma forma desconhecida existente no tecido pulmonar de porquinhos-da-índia, aquando da realização de estudos para a tripanossomose humana americana ou doença de Chagas, devido a um surto que afetava os trabalhadores das vias férreas de Minas Gerais. Nessa altura, os microrganismos encontrados foram interpretados como parte integrante do ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi*. Um ano depois, António Carini observou estruturas semelhantes em tecido pulmonar de rato e supôs tratar-se de um novo microrganismo (Chagas, 1909; Esteves *et al.*, 2014).

Visto este microrganismo ser desconhecido para o investigador - António Carini, o mesmo solicitou ajuda a um parasitologista de prestígio mundial, no Instituto Pasteur de Paris, que através dos seus discípulos, um casal - Pierre e Marie Delanöe – realizaram diversos estudos em torno dos quistos deste microrganismo. Em 1912, este casal de investigadores mostrou que estas formas quísticas não estavam relacionadas com tripanossoma, tendo encontrado as mesmas em ratos do esgoto de Paris. Assim, estes investigadores atribuíram o nome *Pneumo* (pelo seu tropismo pulmonar) e *-cystis* (pela sua morfologia peculiar) a este novo microrganismo, atualmente designado por *Pneumocystis* (Delanöe e Delanöe, 1912; Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

Segundo Calderón-Sandubete *et al.*, (2011), o período entre os anos 1970 e 1980 foi muito marcante para o estudo da pneumocistose com os primeiros estudos com anticorpos isolados de soros de ratos. Com o surgir de divergências entre os resultados dos soros provenientes dos ratos e dos soros humanos, Frenkel, em 1976, considerou que a espécie de *Pneumocystis* que afetava o homem era diferente da que afetava os ratos. Assim, um novo nome é considerado - *Pneumocystis jirovecii* - em homenagem ao cientista Otto Jirovec, que foi o primeiro a relacionar o microrganismo com a pneumonia que afetava bebés humanos ou prematuros em estado de má nutrição.

## Revisão Bibliográfica

Desde então, foram desenvolvidos vários estudos em torno da sua classificação taxonómica que ainda hoje é controversa. Tendo em conta a sua morfologia, necessidades bioquímicas e resposta a agentes quimioterapêuticos, foi considerado protozoário até à década de 80 do século passado.

Posteriormente, com a evolução das técnicas de biologia molecular, foi possível uma classificação definitiva como fungo, considerando-se um fungo atípico por ser suscetível a antiparasitários, por não conter ergosterol na membrana celular e não ter sensibilidade para a maioria dos antifúngicos (Esteves *et al.*, 2014).

Segundo Esteves *et al.* (2014) na década de 80 do século passado, com a epidemia da sida, a pneumocistose era responsável por cerca de dois terços das infeções definidoras de sida, sendo que 80% dos infetados por VIH desenvolvia, pelo menos, um episódio de pneumocistose que, em 20 a 25% dos casos, era mortal.

Tendo em conta o seu importante impacto como agente de morbilidade e mortalidade em doentes imunocomprometidos, quer estejam infetados por VIH, quer sejam doentes sem infeção por VIH com imunossupressão induzida por patologia reumatológica, patologia oncológica, terapêutica imunossupressora, entre outras, torna-se importante explorar este microrganismo/-patologia com vista a minimização deste impacto.

## 1.2 Morfologia e ciclo de vida

A categorização deste microrganismo não tem sido linear visto que anteriormente foi considerado um protozoário com características compatíveis com os fungos, ficando problemática a sua classificação. Em 1970, Vavra e Kucera sugerem que o microrganismo poderia ser um fungo, porém a primeira evidência molecular é declarada por Edman em 1988, devido à sequência de nucleótidos do ARN ribossomal 16 S, assim como a existência de sete genes mitocondriais que revelaram homologia com fungos. Mas outros fatores também foram considerados, nomeadamente a síntese proteica e a existência de timidilato sintase (TS) e de di-hidrofolato refutase (DHFR) que são proteínas distintas, e que nos protozoários funcionam como uma proteína com função dupla. A ausência de ergosterol na membrana é uma característica fenotípica que o distingue de outros fungos, visto que este tem colesterol que existe na sua maioria nos mamíferos. Este facto vai de encontro à sua resistência ao fármaco Anfotericina B (Calderón-Sandubete *et al.*, 2011).

Sendo classificado como fungo, é considerado atípico, extracelular (predominantemente nos alvéolos pulmonares), ubíquo, unicelular, não cultivável em meios de cultura *in-vitro*, com reprodução sexuada e assexuada e estenoxeno (com alta especificidade de hospedeiro).

Atualmente a sua classificação taxonómica é (adaptado de: Calderón-Sandubete *et al.*, 2011):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Pneumocystidomycetes

Ordem: Pneumocystidales

Família: Pneumocystidaceae

Embora tenha sido possível a classificação deste microrganismo, ainda persiste a incapacidade de cultivar *P. jirovecii* *in vitro* ou isolá-lo do ambiente, pelo que se torna difícil definir o seu ciclo de vida completo (Kelly & Shellito, 2010). Contudo, sabe-se que o

ciclo de vida deste microrganismo depende essencialmente do alvéolo pulmonar do hospedeiro e da sua matriz extracelular (Schildgen *et al.*, 2014). *P. jirovecii* foi encontrado nos pulmões de todas as espécies de mamíferos estudadas até ao momento (Kelly & Shellito, 2010) e inicialmente era considerada uma espécie única apenas existente em mamíferos, causando infeção zoonótica em humanos. Descobriu-se recentemente que as diferentes espécies de *Pneumocystis* que infetam diferentes mamíferos são fenotipicamente e geneticamente distintas (Skalski *et al.*, 2015).

Embora tendo presente que este fungo apresenta tropismo para o pulmão, existem alguns relatos da sua deteção em locais extrapulmonares ( Skalski *et al.*, 2015).

No que diz respeito à morfologia de *P. jirovecii*, todos os estádios do seu ciclo de vida (ver Figura 1) foram encontrados nos pulmões de hospedeiros infetados, embora este microrganismo possa infetar outros órgãos (Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

Segundo Calderón-Sandubete *et al.*, (2011) estão descritas três formas morfológicas, que divergem no tamanho, diâmetro da parede celular e filopodia (projeções citoplasmáticas), nomeadamente:

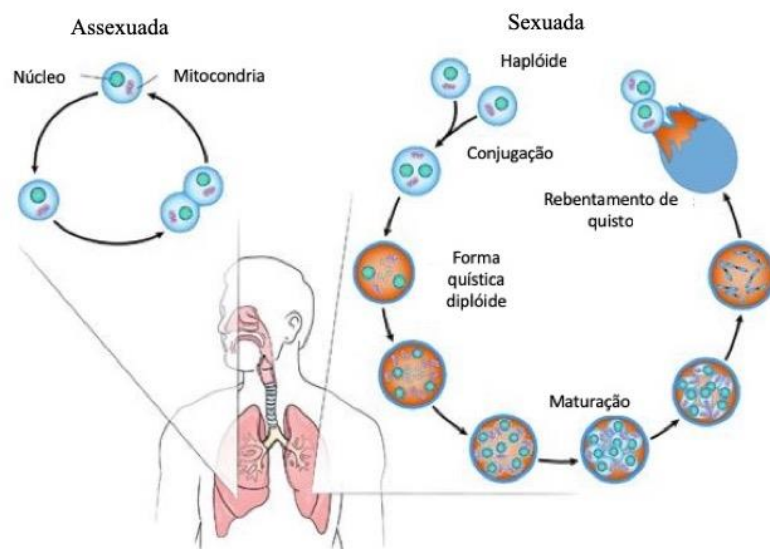


Figura 1. Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii* com reprodução assexuada e sexuada (adaptado de: Skalski *et al.*, 2015)

- **Trófica:** forma mais abundante no pulmão humano, cerca de 90 a 95%. É mononuclear com uma membrana nuclear fina, retículo endoplasmático rugoso e liso

e geralmente uma única mitocôndria, sendo que a maioria destas formas encontradas em organismos infetados são haplóides, embora algumas sejam diplóides. Com formato irregular e variável em comprimento (1 a 8  $\mu\text{m}$ ). Esta é a forma existente quando há infecção ativa e a que adere, através de pseudo-hifas ou filopódia, às células epiteliais alveolares tipo I nos alvéolos do hospedeiro (Skalski *et al.*, 2015).

- **Esporocítica:** forma maior que a forma trófica e mais esférica (4 e 8  $\mu\text{m}$ ). Atravessa três fases que conduzem à formação da forma quística madura. A primeira fase é constituída por um precursor redondo e mononuclear com parede celular fina, tal como a forma trófica, contudo com ausência quase completa de pseudo-hifas. Nesta fase, estão descritas estruturas proteicas associadas à divisão meiótica, que sugerem reprodução sexual. A segunda fase é caracterizada por um espessamento da parede celular de 40 nm a 100 nm, com divisão nuclear. Na terceira fase, a forma aparenta um quisto com oito núcleos bem definidos, distinguindo-se da forma final por ainda não possuir oito corpos intra-quísticos ou ascospores bem definidos e com organitos associados (Skalski *et al.*, 2015).
- **Quística ou asco:** forma muito semelhante a um esporo com parede celular espessa e com uma membrana externa, apresentando comprimento variável entre os 4-8  $\mu\text{m}$ . Apresenta oito corpos intra-quísticos ou ascospores, em que cada um deles mede cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro e apresenta uma membrana dupla, com um único núcleo e uma mitocôndria (ver Figura 2). Foi observada a libertação de formas tróficas jovens pelo quisto maduro que *à posteriori* se ligam às células epiteliais alveolares tipo I do hospedeiro. Esta forma será provavelmente a forma de sobrevivência de *P. jirovecii*, fora do pulmão (Skalski *et al.*, 2015).

## Revisão Bibliográfica

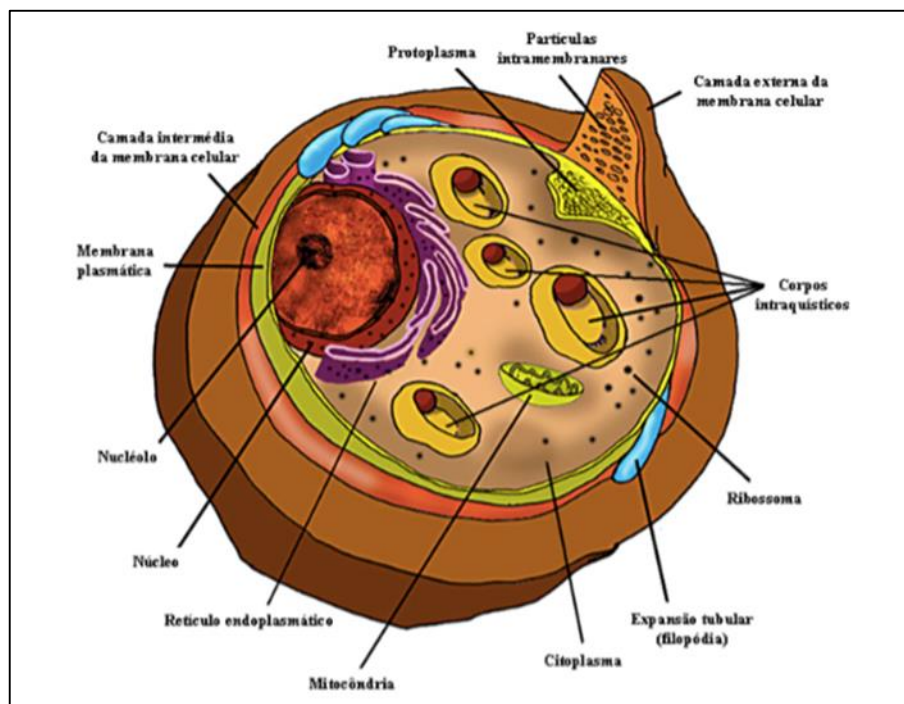


Figura 2. Representação esquemática das principais estruturas da forma quística de uma célula de *P. jirovecii* (adaptado de: de Souza & Benchimol 2005).

### 1.3 Epidemiologia

A pneumonia por *P. jirovecii* (PPc) tem sido uma das principais causas de morbidade em doentes infetados por VIH, algo que tem sofrido um declínio com a utilização de terapêutica anti-retrovírica combinada (TARVc), embora esta patologia ainda se mantenha como uma das infeções mais frequentes nesta tipologia de doentes, assim como nos países em vias de desenvolvimento, devido ao difícil acesso a esta terapêutica. Durante os primeiros anos da epidemia da sida no início dos anos 80, foi a PPc que permitiu o seu diagnóstico em dois terços dos doentes nos Estados Unidos da América (EUA) (Morris *et al.*, 2004), e deixou de ser uma doença rara para passar a ser uma doença comum. Durante a segunda guerra mundial, surgiram os primeiros relatos desta patologia em crianças desnutridas residentes em orfanatos europeus e iranianos. Posteriormente começou também a ser evidente a existência desta pneumonia em doentes imunocomprometidos por patologia e terapia imunossupressora.

Em 1981 foi identificado uma potencial síndrome de imunodeficiência humana, tendo sido nessa altura identificados os primeiros casos de PPc pelo *Center for Disease Prevention and Control* (CDC) dos EUA, em cinco jovens homossexuais na cidade de Los Angeles, pelo que a PPc começou a ser integrada no grupo das doenças oportunistas (Esteves *et al.*, 2014). Desta forma constituíram-se grupos de risco, nomeadamente indivíduos homossexuais e utilizadores de drogas endovenosas, tendo ocorrido um declínio acentuado da incidência desta doença após introdução de terapêutica profilática dirigida em 1989 (Morris *et al.*, 2004). No entanto, esta doença ainda tem grande impacto nos doentes infetados por VIH. Nos EUA, esta doença definidora de sida, ainda se desenvolve em mais de 60% dos doentes durante o curso da infeção por VIH (Sokulska *et al.*, 2015), sendo numa prioridade epidemiológica.

Segundo Esteves *et al.* (2014), antes de serem adotadas medidas profiláticas, 80% dos infetados por VIH desenvolvia pelo menos um episódio de pneumocistose que era mortal em 20 a 25% dos casos. A gravidade da pneumonia requeria uso de ventilação mecânica invasiva, sendo que em algumas unidades de cuidados intensivos, a taxa de mortalidade ultrapassava os 80%.

Existem alguns estudos realizados na América Latina que, apesar de revelarem grande

heterogeneidade na prevalência da infecção por VIH e na disponibilidade da TARVc, a apresentam frequência de pneumocistose que variam entre os 6% e os 55%. No Brasil, a prevalência da pneumocistose, nos doentes com sida, atinge os 55% e nos países da América Central, situa-se entre os 24 e 29% (Esteves *et al.*, 2014).

Atualmente uma das situações problemáticas reside no facto de alguns doentes com infecção por VIH, se encontrarem privados de cuidados médicos e/ ou terapêutica, nomeadamente em países de baixo-médio rendimento, como o Quênia, África do Sul, México, entre outros. Ou não têm consciência da sua seropositividade para VIH (Sokulska *et al.*, 2015). Outros grupos de risco, que englobam indivíduos sem infecção por VIH, com imunodeficiência congénita, secundária a citotóxicos, terapêutica imunossupressora, condição oncológica/ hematológica/ reumatológica, assim como dadores de órgãos, constituem outro obstáculo ao controlo desta pneumonia, podendo tornar-se um grave problema de saúde pública (Sokulska *et al.*, 2015). Por outro lado, com o progresso da biologia molecular, aquando da realização de técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase), foi descoberto ADN de *Pneumocystis* em amostras respiratórias de pessoas assintomáticas, ficando demonstrada a possibilidade de existência de casos de colonização por *P. jirovecii*. Esta constatação é muito marcante pois há aumento do risco de progressão do estágio de colonização para PPC se surgir uma imunodeficiência. Estas pessoas colonizadas também funcionam como fontes de infecção para outras pessoas. Por último a própria infecção consecutivamente possibilita a ocorrência de transmissão para outras pessoas e a infecção latente pode levar a uma inflamação prejudicial do tecido pulmonar (Morris *et al.*, 2004).

## 1.4 Fisiopatologia da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

### 1.4.1 Modo de transmissão da PPc

*Pneumocystis jirovecii*, como fungo atípico, oportunista, de localização extracelular, com tropismo para os alvéolos pulmonares do ser humano é capaz de causar pneumonia severa em indivíduos imunocomprometidos (Grilo & Pereira, 2016). Ainda atualmente, o modo de infeção por *Pneumocystis* não é totalmente compreendido e considerava-se que os doentes são infetados em idades muito precoces e que num indivíduo imunocompetente, a infeção pode ser devidamente controlada. Neste caso, o aparecimento de sintomatologia associada pode resultar da reativação da infeção latente. Contudo, investigações recentes sugerem que esta patologia pode não ser o resultado de uma reativação de uma infeção latente, mas sim da reinfeção a partir de uma fonte humana ou ambiental ainda desconhecida (Kelly & Shellito, 2010). Resumindo, ambas as situações são possíveis.

Está demonstrada que a exposição primária ao microrganismo é frequente nos primeiros anos de vida, geralmente seguida de episódios de bronquiolite e síndrome de morte súbita no lactente, devido à indução de aumento de secreções no pulmão do bebé (Esteves *et al.*, 2014). Atualmente a hipótese mais aceite considera que a transmissão de *P. jirovecii* ocorre através da inalação de quistos, como doença transmissível, por contacto próximo ou por via aérea, em doentes imunodeficientes, e que o tabagismo e a poluição do ambiente podem induzir respostas dos anticorpos anti-*P. jirovecii* (Grilo & Pereira, 2016; Blount *et al.*, 2017;). No entanto, a ligação de *P. jirovecii* ao macrófago não induz a ativação desta célula nem a fagocitose do parasita, visto que a sua internalização e degradação dependente da opsonização com anticorpos específicos e complemento (Stringer, 2005).

#### 1.4.2 Alterações alveolares e resposta imunológica

O microrganismo adere aos pneumócitos tipo I através dos seus filopodes e glicoproteínas existentes no hospedeiro, desencadeando-se a partir daí a sua proliferação. No que diz respeito ao processo de interação fungo-hospedeiro, os recetores da parede celular fúngica desencadeiam uma interação com as proteínas do hospedeiro, mediada por exemplo através da fibronectina ou fibrinogénio. No caso de *P. jirovecii*, a ligação às células epiteliais do pulmão, para desenvolver o processo de infeção, é mediada por integrinas de ligação à fibronectina, vitronectina e recetores de manose, desencadeando vias inflamatórias que induzem a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos alveolares e células CD 4<sup>+</sup> (Matos *et al.*, 2017). Com estas últimas células em número insuficiente, é gerada uma resposta inflamatória descontrolada que causa dano alveolar, compromete as trocas gasosas e consequentemente provoca insuficiência respiratória global, podendo condicionar a sobrevivência do doente. Esta interação microrganismo-hospedeiro requer uma série de recetores que vão desencadear todo o processo inflamatório.

A glicoproteína mais abundante na superfície de *P. jirovecii* é a glicoproteína major de superfície (MSG) ou glicoproteína (gpA) que tem um papel facilitador na interação com o hospedeiro (Kutty *et al.*, 2013; Tomás *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2017), visto que representa uma família de proteínas codificadas por cerca de 100 genes (Walzer, 1999), apresentando desse modo capacidade de variação genética (Gingo *et al.*, 2011; Tomás *et al.*, 2016).

Durante a quimiotaxia, os macrófagos alveolares, como células multifuncionais representantes da defesa, inflamação e reparação tecidual são capacitadas para a preservação da defesa do hospedeiro (Bhagwat *et al.*, 2018). Contudo como os macrófagos alveolares necessitam que o produto dos linfócitos (IFN- $\gamma$ ), seja eficaz na defesa do hospedeiro, caso o doente se encontre em imunodepressão independentemente da causa, torna-se um problema no desenvolvimento da infeção (Morris *et al.*, 2004).

Outros recetores assumem importância, nomeadamente o recetor B-glucano, também com papel na ligação dos quistos do microrganismo aos macrófagos e consequentemente na resposta inflamatória. O B-glucano encontra-se na superfície das células fagocíticas, tendo a função de reconhecimento das porções de recetores na parede celular de organismos

fúngicos, assim como a indução da produção de fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) (Kelly & Shellito, 2010; Matos *et al.*, 2017).

Outra classe de recetores nos macrófagos alveolares com relevância na resposta inflamatória são os *Toll-Like* (TLR's), principalmente o recetor TLR-2, segundo evidência de estudos recentes, visto que os macrófagos alveolares expostos ao microrganismo requerem a revelação deste recetor para expressar a inter-leucina 8 (IL-8). Caso esse recetor não esteja presente, está comprovado o aumento da carga fúngica / gravidade da PPc e dessa forma ausência da eliminação do microrganismo do hospedeiro afetado (Kelly & Shellito, 2013).

As proteínas surfactantes, presentes nos alvéolos pulmonares, têm função de minimização da tensão alveolar, impedindo o seu colapso, intervenção na imunidade inata do pulmão e remoção de fungos. Pelo que, se houver alguma desordem nestas proteínas, haverá aumento significativo da tensão alveolar e insuficiência respiratória nos doentes com PPc (Kelly & Shellito, 2010).

A infecção por *Pneumocystis* é eliminada principalmente através da imunidade mediada por células, embora a imunidade humoral seja também considerada fundamental (Blount *et al.*, 2017), pelo que se a imunidade celular estiver comprometida é geralmente considerada o principal fator predisponente para a proliferação do microrganismo (Matos *et al.*, 2017).

Tendo em consideração o papel fulcral dos macrófagos alveolares e recetores envolvidos, a imunidade inata assume relevância no reconhecimento / eliminação / resolução da infecção por *Pneumocystis*, assim como na ativação de respostas adaptativas a longo prazo (Kelly & Shellito, 2010). A imunidade adaptativa, por sua vez, é crucial na amplificação da resposta celular inata, controlando o agente invasor e mantendo a proteção da memória de longo prazo (Matos *et al.*, 2017).

No envolvimento de todo o sistema imunológico, as células T CD4<sup>+</sup> adquirem uma importância acrescida porque detêm um papel central no controlo da infecção por *P. jirovecii*, nomeadamente nas funções das células de memória, com potencial de coordenação da resposta inflamatória, do recrutamento e ativação das células efetoras, de forma a conduzir à eliminação do microrganismo (Stringer, 2005). Torna-se então evidente a importância da intervenção destas células no erradicar do microrganismo, embora existam estudos que

demonstram que a resposta exacerbada desencadeada pelas mesmas pode induzir uma resposta inflamatória capaz de comprometer as trocas gasosas durante a PPc, tornando-se controverso o seu papel benéfico versus malefício nesta patologia. Também, as células T CD8<sup>+</sup>, embora não representem a causa da lesão pulmonar, ao aumentar a resposta inflamatória em parceria com as células T CD4<sup>+</sup>, a sua presença impulsiona danos do hospedeiro, no seu processo de doença (Morris *et al.*, 2004). Portanto, torna-se evidente que a gravidade clínica da pneumonia por *Pneumocystis* correlaciona-se diretamente com o aparecimento de marcadores pulmonares de inflamação (Wright *et al.*, 1999).

Aquando da resposta humoral, embora ainda não haja esclarecimento definitivo acerca da proteção do organismo ser mediada por anticorpos ou induzida através da ativação de células T CD4<sup>+</sup>, as células B adquirem também importância no combate à PPc, visto que em estudos realizados em modelos animais, foram comprovados efeitos óbvios na produção de anticorpos e na apresentação de antígenos (Matos *et al.*, 2017).

## 1.5 Abordagem clínica e terapêutica

A pneumonia é um processo patológico complexo que envolve a acumulação de edema e células inflamatórias nos alvéolos em resposta à proliferação de microrganismos no parênquima pulmonar, o qual normalmente é um meio estéril. A resposta imunitária que leva ao processo inflamatório, constitui a clínica da pneumonia (Fein *et al.*, 2006).

De uma forma geral, a pneumonia por *P. jirovecii* apresenta-se como uma infecção pulmonar num hospedeiro imunocomprometido, seja infetado por VIH ou com outro tipo de patologia com imunossupressão inerente. No que diz respeito ao quadro clínico, variável de indivíduo para indivíduo, na sua globalidade e numa fase inicial da doença aglomera os sintomas de dispneia, tosse não produtiva, febrícula ou ausência de febre, mal-estar e toracalgia com dor pleurítica. Aquando do agravamento do quadro, além de febre, surge dispneia franca com infiltrados difusos, visíveis no controlo radiológico.

Em doentes não infetados por VIH, o quadro clínico tem um começo mais rápido que nos infetados por VIH. Naqueles doentes há tosse, febre, um agravamento gradual e progressivo da dispneia, surge cianose, anorexia, perda de peso, diarreia, embora a tosse e a febre possam estar ausentes também (Calderón *et al.*, 2010).

Contudo, através da averiguação de toda a história clínica do doente com índice de suspeita, esta patologia pode ser detetada precocemente. A auscultação pulmonar não costuma ter alterações maiores, a nível gasométrico os doentes podem apresentar hipoxemia com alcalose respiratória, mas também apresentar valores normais, caso estejam no início do processo de doença. A pressão parcial de oxigénio (PaO<sub>2</sub>) menor do que 70 mm Hg deverá ser indicativo de PPc (Matos *et al.*, 2017).

Já a nível analítico, estes doentes apresentam níveis séricos altos de lactato desidrogenase (LDH) que refletem lesão do tecido pulmonar (Calderón *et al.*, 2010). Esta pneumonia ocorre mais frequentemente em doentes com células T CD 4<sup>+</sup> ≤ 200/μL, tendo em conta o nível de imunodeficiência do doente (Matos & Esteves, 2016).

Do ponto de vista radiológico, as características da PPc em doentes imunocomprometidos infetados e não infetados por VIH, são infiltrados intersticiais reticulares bilaterais, simétricos, finos envolvendo as áreas peri-hilares, tornando-se mais homogêneos e difusos proporcionalmente à gravidade da infeção. No entanto, há relatos de outras apresentações radiográficas relacionadas com PPc, nomeadamente infiltrados assimétricos, densidades nodulares, lesões cavitárias, linfadenopatias, derrames pleurais, enfisema e pneumotórax (Calderón *et al.*, 2010). Em estádios iniciais de doença a radiografia do tórax pode não apresentar alterações (Matos *et al.*, 2017).

O comprometimento respiratório e a morte de doentes com PPc relacionam-se intimamente com a extensão da inflamação pulmonar, daí haver resposta favorável aquando da administração de anti-inflamatórios, corticosteroides e antibioterapia dirigida. A figura seguinte (Figura 3) representa um raio-x tórax de um doente com PPc.

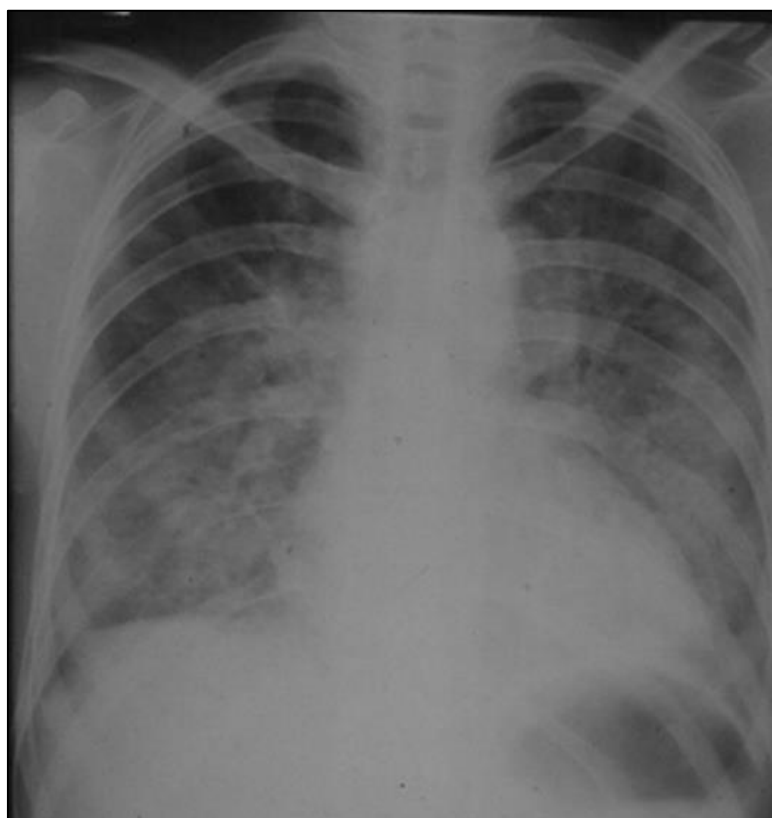


Figura 3. Rx tórax de doente com pneumonia por *P. jirovecii* (imagem retirada de Matos *et al.*, 2017, com autorização do autor)

Embora escassas, estima-se que em cerca de menos de 2.5% dos doentes, existam algumas manifestações extrapulmonares da infeção por *P. jirovecii*, relatadas principalmente em doentes infetados por VIH (Calderón *et al.*, 2010). O envolvimento pulmonar concomitante pode ocorrer e estão descritos casos de invasão dos nódulos linfáticos, baço, fígado, trato gastrointestinal, pâncreas, olhos, ouvidos, glândulas suprarrenais, tiróide e sistema nervoso central (SNC) (Matos *et al.*, 2017).

Tendo em conta os quadros clínicos que podem surgir, o diagnóstico clínico torna-se um processo complicado visto não haver uma combinação de sinais e sintomas específicos, controlo analítico ou achado radiológico individualizado para esta pneumonia, daí haver necessidade de o diagnóstico definitivo ser feito através de técnicas de laboratório específicas.

Nos últimos anos têm surgido desenvolvimentos na prevenção e tratamento da PPc (Tomio *et al.*, 2005). Atualmente o antibiótico de primeira linha direcionado para o tratamento/profilaxia da PPc é o sulfametoxazol + trimetropim, apesar de existirem fármacos de segunda linha, nomeadamente pentamidina, clindamicina + primaquina e atovaquona (Skalski *et al.*, 2015).

## 1.6 Diagnóstico da PPc

O diagnóstico presuntivo de PPc incide nas manifestações clínicas, testes de função pulmonar, resultados gasimétricos realizados com o doente em esforço e em repouso, e avaliações não específicas, nomeadamente o raio-x do tórax e exames laboratoriais (Matos & Esteves, 2016). Existem métodos de diagnóstico da PPc que têm em conta a sua sensibilidade e especificidade, os custos dos mesmos, o potencial dos espécimes biológicos utilizados, e as vantagens e desvantagens inerentes.

Para determinar o diagnóstico da PPc são necessários espécimes cuja obtenção exige técnicas invasivas, nomeadamente através de biópsia pulmonar e/ ou brônquica, lavado bronco-alveolar (LBA) e secreções brônquicas, embora possam ser utilizados espécimes obtidos através de técnicas menos invasivas como o aspirado nasofaríngeo e a expetoração induzida (Tomás *et al.*, 2016).

A biópsia pulmonar permite a observação do microrganismo em mais de 95% dos casos de infeção por *P. jirovecii*. A análise do LBA - obtida através de broncofibroscopia - permite o diagnóstico em mais de 80% de todos os doentes com PPc e em mais de 95% doentes infetados por VIH (Tomás *et al.*, 2016).

A realização do diagnóstico de pneumocistose extrapulmonar é possível através da observação das formas quísticas ou tróficas de *P. jirovecii* nos tecidos afetados. As formas quísticas de *P. jirovecii* são geralmente detetadas através de métodos colorimétricos ou moleculares (Calderón *et al.*, 2010).

Ao longo dos tempos, vários métodos de coloração foram desenvolvidos para executar o diagnóstico de PPc através da revelação da morfologia e características das formas de desenvolvimento de *Pneumocystis* identificadas nos espécimes respiratórios em análise, como gomori metenamina-prata (GMS), Giemsa, ou outras colorações semelhantes (Tomás *et al.*, 2016).

Desde 1986 a imunofluorescência indireta (IF-MAb) tem vindo a ser implementada, tornando-se num dos métodos referência para a observação da morfologia das formas

quísticas. Dada a sua sensibilidade e especificidade tornou-se um método adequado para aplicar em amostras biológicas de menor rendimento (com menor carga fúngica) como por exemplo a expetoração induzida (Tomás *et al.*, 2016).

Têm sido desenvolvidos diversos ensaios de técnicas de PCR ao longo dos últimos 20 anos para o diagnóstico precoce da PPc, e este procedimento revelou a sua eficácia na amplificação do ADN de *Pneumocystis* a partir de uma variedade de amostras respiratórias, quer sejam obtidas por métodos menos invasivos ou mesmo não invasivos, embora a sensibilidade seja afetada pela carga fúngica que existe nesta tipologia de amostras (Tomás *et al.*, 2016). A nível de resultados, por vezes existe ambiguidade na interpretação dos resultados da PCR. Um teste de PCR positivo pode estar associado a uma análise por microscopia negativa, processo associado a colonização por *P. jirovecii*. Na prática clínica, a colonização por este microrganismo é considerada quando o ADN de *P. jirovecii* é detetado por PCR numa amostra biológica de um indivíduo imunocomprometido ou imunocompetente sem manifestações clínicas de PPc, sendo também acompanhado por um resultado microscópico negativo (Tomás & Matos, 2018). Assim, para a elaboração de um diagnóstico efetivo dever-se-á ter em conta os sinais e sintomas dos doentes e os exames complementares de diagnósticos radiológicos e laboratoriais (Matos *et al.*, 2017).

### **1.6.1 Novas abordagens de diagnóstico**

Atualmente, as técnicas de referência englobam o exame histológico de amostras respiratórias (lavado broncoalveolar, secreções brônquicas e expetoração induzida), técnicas de coloração histoquímica, técnicas de imunofluorescência com anticorpos monoclonais e técnicas de biologia molecular. O diagnóstico laboratorial depende da visualização / deteção de *Pneumocystis* em espécimes respiratórios, através das técnicas de referência citadas anteriormente, que embora eficazes têm algumas desvantagens, nomeadamente o facto de serem demoradas, dispendiosas e necessitarem de utilizar técnicas invasivas para a colheita das amostras biológicas a analisar.

Com o propósito de minorar estas desvantagens, e de forma a encontrar métodos simples aplicados a amostras biológicas de obtenção minimamente invasivas (como o sangue, saliva),

## Revisão Bibliográfica

com vista à detecção rápida e eficaz do agente causador da pneumonia, tornou-se uma necessidade urgente o desenvolvimento de uma técnica com estas características (Tomás & Matos, 2018).

A técnica ideal é aquela que é capaz de identificar todos os casos de doença, altamente sensível. Ao mesmo tempo, deverá ser capaz de identificar corretamente todas as pessoas que não têm a doença, sendo específica para a patologia (Tomás *et al.*, 2016).

É do conhecimento médico que a infecção por *P. jirovecii* ocorre geralmente no tecido pulmonar do ser humano, mas ainda não existe um conhecimento aprofundado acerca da resposta de anticorpos locais a *P. jirovecii*, assim como não se conhecem bem os fatores clínicos e ambientais que impulsionam essas respostas (Blount *et al.*, 2017). Assim, dada a necessidade de contornar as desvantagens das abordagens diagnósticas existentes, o Grupo de investigação em Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do IHMT desenvolveu um antigénio recombinante sintético (ARS) específico de *P. jirovecii* capaz de detetar, de forma sensível e específica, os anticorpos IgM e IgG anti-*P. jirovecii* em amostras de soro. Como foram obtidos bons resultados na pesquisa destas imunoglobulinas, tornou-se também relevante explorar o potencial da IgA secretória anti-*P. jirovecii* na saliva de indivíduos com infecção por *Pneumocystis*.

Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas estruturalmente relacionadas produzidas nos vertebrados. Estes anticorpos são sintetizados exclusivamente pelas células B nos vertebrados, como resposta a exposições a antigénios (Abbas *et al.*, 2015), apresentando sequências de aminoácidos diferentes e são consideradas as proteínas mais abundantes no sangue, constituindo cerca de 20% da proteína total existente no plasma (Alberts *et al.*, 2007). Após ligação das imunoglobulinas a um determinado agente patogénico, além de o inativar, induzem o recrutamento de componentes da imunidade inata (Alberts *et al.*, 2007). A IgA corresponde à principal classe de anticorpos existente nas secreções, saliva, lágrimas, leite e secreções respiratórias e intestinais (Alberts *et al.*, 2007). Esta imunoglobulina é considerada a defesa humoral de primeira linha contra microrganismos das vias aéreas e é possível que uma resposta baixa desta imunoglobulina seja um fator predisponente para o desenvolvimento de PPC (Blount *et al.*, 2017).

## 2. OBJETIVOS

A grande questão científica do presente estudo está focada na determinação do poder diagnóstico das IgA secretórias anti-*P. jirovecii* presentes na saliva no diagnóstico da PPc.

Assim, os objetivos principais do estudo são:

- 1) Avaliar os níveis de IgA anti-*P. jirovecii* presentes na saliva de doentes com PPc e em doentes com outras patologias pulmonares, recorrendo ao antígeno recombinante sintético de *P. jirovecii* como ferramenta antigénica.
- 2) Identificar níveis de IgA anti-*P. jirovecii* com significado para o diagnóstico da PPc e aplicá-los no desenvolvimento de uma plataforma imunoenzimática de diagnóstico da PPc.

Para alcançar o objetivo principal deste projeto, alguns objetivos secundários têm também de ser obtidos:

- 1) Estabelecer o diagnóstico da existência ou ausência de PPc em todos os doentes incluídos no estudo, através da interpretação dos resultados laboratoriais de pesquisa de *P. jirovecii* nas secreções brônquicas e dos dados clínicos dos doentes.
- 2) Aplicar o antígeno recombinante sintético de *P. jirovecii*, baseado na glicoproteína major de superfície de *P. jirovecii*, no desenvolvimento de uma técnica de ELISA para deteção das IgA anti-*P. jirovecii* presentes na saliva dos doentes.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Resumo da sequência/etapas do projeto

A metodologia utilizada neste projeto envolveu as seguintes etapas:

1. Recolha de amostras biológicas (saliva, sangue e secreções brônquicas) a 85 doentes com os seguintes **critérios de inclusão** (doentes com patologia pulmonar com idade igual ou superior a 18 anos que acedam participar no estudo) e de **exclusão** (doentes sem patologia pulmonar; doentes com patologia pulmonar com idade igual ou superior a 18 anos que não acedam participar no estudo; doentes com patologia pulmonar com idade inferior a 18 anos).
2. Processamento das amostras biológicas;
3. Diagnóstico laboratorial da PPc por realização das técnicas de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM) e *nested*-PCR para amplificação do gene *mtLSUrRNA* nas secreções brônquicas de todos os doentes;
4. Desenvolvimento de um protocolo de ELISA para pesquisa de IgA anti-*P. jirovecii* na saliva dos doentes;
5. Composição de uma base de dados com toda a informação recolhida nos questionários realizados e com todos os resultados laboratoriais com posterior análise estatística dos mesmos.

### **3.2 Recolha de amostras biológicas**

Para este estudo foram recolhidas amostras biológicas (secreções brônquicas, sangue e saliva) de 85 doentes com idade igual ou superior a 18 anos, com patologia pulmonar (pneumonia bacteriana, fibrose pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crónica ou neoplasias) durante nove meses (fevereiro de 2018 até setembro de 2018), no Serviço de Técnicas de Pneumologia do Hospital de Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental. Todos os participantes foram voluntários, requerendo um consentimento informado (Anexo I. Consentimento Informado). A todos foram devidamente transmitidos os objetivos do estudo, respetiva metodologia e os benefícios inerentes ao mesmo. A identificação dos doentes que participaram no estudo foi anónima. Este estudo teve a aprovação da Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (Anexo II), da Comissão Nacional de Proteção de Dados (Anexo III) e da Comissão de Ética do IHMT (Anexo IV).

#### **3.2.1 Ficha de Dados Clínicos**

Os dados demográficos e clínicos foram colhidos pelas equipas de enfermagem e médica da sala de técnicas pneumológicas do Hospital Egas Moniz, mediante um questionário padrão que incluiu informação demográfica (idade, sexo) e parâmetros clínicos (sinais vitais, radiológicos, gasométricos, doença de base, tratamento instituído) tendo sido fornecido o consentimento informado, que o doente envolvido previamente leu e assinou para a realização do projeto (ver Anexo V. Ficha de Dados Clínicos ).

#### **3.2.2 Colheita de saliva - *Kit salivette***

Amostras de saliva foram colhidas dos doentes pelas enfermeiras da sala de técnicas de pneumologia e posteriormente processadas para titulação de IgA secretória anti-*P. jirovecii* por ELISA. Os *kits* para recolha de saliva (Tubo *Salivette*® para colheita de saliva, com *swab* em algodão – SARSTEDT, SA) foram fornecidos pelos laboratórios do Grupo Protozoários

Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, IHMT ao Serviço de Técnicas Pneumológicas do Hospital de Egas Moniz.

Passos envolvidos na recolha de saliva:

1. Remover a tampa superior do tubo;
2. Remover o algodão presente no tubo;
2. Colocar o algodão sob a língua e aguardar cerca de 2-3 minutos (podendo ser mastigado gentilmente);
4. Remover o algodão da boca;
5. Colocar o algodão no tubo de colheita e fechar a tampa.

Somente os doentes que cumpriam todos os requisitos pré-analíticos para uma correta obtenção de amostra de saliva participaram no estudo. Os requisitos pré-analíticos aplicados foram:

1. Fazer a colheita da saliva antes da recolha das secreções brônquicas ou lavado broncoalveolar e, preferencialmente, de manhã em jejum;
2. Durante o período da colheita não permitir a ingestão de água, alimentos ou qualquer tipo de líquidos;
3. A colheita deve ser feita, pelo menos, 3 horas após as refeições principais e não se deve ingerir nenhum alimento ou bebida (com exceção de água) até 30 minutos antes da colheita;
4. Não se deve escovar os dentes nas 3 horas antecedentes à colheita;
5. Não deve ter sido realizado tratamento dentário nas últimas 24 horas.

### **3.2.3 Colheita de secreções brônquicas**

Foram colhidas amostras de secreções brônquicas dos doentes envolvidos no estudo através de broncofibroscopia realizada pela equipa médica do serviço de Pneumologia do Hospital

## Material e Métodos

Egas Moniz, para se proceder ao diagnóstico laboratorial padrão da pneumocistose e consequentemente categorizar os doentes nos grupos clínicos de interesse.

### **3.2.4 Colheita de sangue periférico**

Foram colhidas amostras de sangue venoso periférico (3 ml) aos doentes, posteriormente processadas com o objetivo inicial de titulação de IgG, IgM e IgA anti-*P. jirovecii* por ELISA, para determinação do melhor marcador serológico da infeção. Os tubos para recolha de uma amostra de sangue (S-Monovette® 4.9 ml, *Serum Gel with Clotting Activator*, 90x13 mm – SARSTEDT, SA), por doente, foram fornecidos pelo IHMT à Sala de Técnicas pneumológicas do HEM.

As amostras de sangue dos doentes foram processadas, contudo a colheita não foi possível em alguns dos mesmos (deficiência de acessos venosos periféricos, recusa por parte de alguns doentes e gestão dos profissionais na sala de técnicas), pelo que, tendo em conta o cronograma para a realização desta tese, as amostras ficaram disponíveis para posterior estudo no IHMT.

### 3.3 Processamento das amostras biológicas

#### 3.3.1 Secreções brônquicas

Após colheita por broncofibroscopia na sala de técnicas, cada amostra de secreções brônquicas necessitou de ser processada para posteriormente ser analisada. Foi acondicionada uma alíquota com 1 mL da amostra original, em tubos *ependorf* estéreis, tendo sido devidamente identificados – SB (secreções brônquicas) + n° do doente (por exemplo: n°2).

Após observação/avaliação da consistência da amostra adicionou-se ditioneitol (DTT) 0.1% até um máximo do mesmo volume existente no tubo da amostra, de forma a solubilizar as partículas e agregados de muco presentes na mesma. Homogeneizou-se bem no vórtex e colocou-se na estufa a 37°C durante 10 minutos, homogeneizando posteriormente no vórtex até remoção do muco que estivesse presente. De seguida, transferiu-se a amostra para um tubo de centrífuga e adicionou-se igual volume de PBS 1x estéril. Posteriormente a amostra foi submetida a centrifugação a 5000g durante 15 minutos. De forma a não ficar muito concentrada, ressuspendeu-se o sedimento em cerca de 3mL de PBS 1x estéril e transferiu-se a amostra já processada para tubos *ependorf* estéreis (máximo 1 mL por tubo) e identificaram-se os tubos (exemplo: SBp + número do doente).

Com as secreções processadas, foram realizados dois esfregaços com cerca de 20 µL de amostra processada, em lâminas revestidas com poli-L-lisina que melhorou a aderência das células às lâminas, as quais foram identificadas com o número do doente correspondente. Os esfregaços secaram à temperatura ambiente e foram fixados com solução de acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente. Os esfregaços que não seguiram para análise laboratorial, ficaram armazenados a -20°C.

#### 3.3.2 Saliva

Os tubos *salivette* foram submetidos a centrifugação a 1000g durante 2 minutos, conforme indicação do fabricante. A saliva foi transferida para tubos *ependorf* estéreis (máximo 1 mL

## Material e Métodos

por tubo) e foram devidamente identificados da seguinte forma (exemplo: SV + N° do doente). Posteriormente ficaram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem analisadas.

### **3.3.3 Sangue**

As amostras de sangue foram submetidas ao processo de centrifugação a  $5000g$  durante 12 minutos, e seguidamente os soros foram transferidos para tubos *ependorf* estéreis (máximo 1 mL por tubo) que foram identificados da seguinte forma (exemplo: S + n° do doente). As amostras foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### 3.4 Diagnóstico laboratorial da PPc

#### 3.4.1 Detecção de *Pneumocystis jirovecii* em espécimes pulmonares por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM)

Esta técnica foi realizada com o *Kit MonoFluo® P. jirovecii* da BioRad®, sendo considerada referência para o diagnóstico da PPc, em amostras de secreções pulmonares, pois é bastante sensível na detecção de quistos deste microrganismo (Lautenschlager *et al.*, 1996; Bava *et al.*, 2002). Diluiu-se a enzima 1:10 em tampão de diluição de enzima, perfazendo um volume total de 20µL por cada esfregaço processado. Seguidamente foram colocados 20µL de enzima diluída em cada esfregaço e espalhou-se, cuidadosamente com a ponta da pipeta, para não danificar o esfregaço. Procedeu-se à incubação dos esfregaços em câmara húmida, durante 30 minutos a 37°C. As lâminas foram lavadas cuidadosamente com água destilada e ficaram a secar à temperatura ambiente.

De seguida, foram aplicados 20µL de anticorpo monoclonal em cada esfregaço, espalhando cuidadosamente este volume pela totalidade do esfregaço. Os esfregaços foram novamente colocados em câmara húmida durante 15 minutos, a 37°C. As lâminas foram lavadas cuidadosamente com água destilada e deixadas a secar à temperatura ambiente. Foram aplicados 20µL de conjugado em cada esfregaço, espalhando cuidadosamente este volume pela totalidade do esfregaço. Os esfregaços foram novamente incubados em câmara húmida, durante 15 minutos a 37°C. Outra lavagem, foi realizada com água destilada e as lâminas ficaram a secar novamente à temperatura ambiente.

Para observar no microscópio de fluorescência foram adicionadas 1 a 2 gotas de meio de montagem fornecido pelo *kit* e aplicada uma lamela sobre este meio, sem formar bolhas. Observou-se a preparação no comprimento de onda de 475nm e pesquisou-se a presença de formas quísticas de *P. jirovecii* na totalidade do esfregaço.

### 3.4.2 Amplificação do gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii* por *nested-PCR*

Esta técnica tem dois momentos de amplificação, utilizando dois conjuntos de *primers*, um externo para a primeira parte da reação e outro interno para a segunda parte da reação, conforme descrito anteriormente (Wakefield *et al.*, 1990). Para cada amostra foram preparadas duas misturas reacionais. Para monitorizar a qualidade dos resultados, em cada reação de amplificação utilizou-se um controlo positivo, constituído por uma suspensão de ADN de *P. jirovecii*, e um controlo negativo, que consistia em água desionizada estéril. Toda a preparação foi realizada numa câmara de fluxo laminar e posteriormente os tubos de PCR foram transferidos para um termociclador (*Biometra® T1 Thermocycler*) com as condições térmicas de amplificação descritas no Quadro. 1.

*Quadro. 1 Condições térmicas utilizadas na realização da nested -PCR para amplificação específica do gene mtLSUrRNA de P. jirovecii*

Condições Térmicas na Amplificação	Duração e n-ciclos
Desnaturação inicial a 95°C	3 Minutos 1 Ciclo
Desnaturação a 95°C Ligação a 55°C Extensão a 72°C	1.5 Minutos nas duas primeiras fases, e a extensão a 2 minutos, 40 Ciclos
Extensão final a 72°C	10 Minutos 1 Ciclo

Todas as bandas de interesse amplificadas foram purificadas após eletroforese em gel de agarose pelo *kit JetQUICK Purification Spin kit da GENOMED®* e enviadas para sequenciação na empresa Stabvida ®.

### **3.5 ELISA para detecção de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* em amostras de saliva**

#### **3.5.1 Antígeno recombinante sintético da glicoproteína major de superfície (Msg) de *P. jirovecii***

O Grupo de investigação em Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do IHMT desenvolveu um antígeno recombinante sintético específico de *P. jirovecii*, baseado na sequência nucleotídica da MSG de *P. jirovecii*. Estudos anteriores com este antígeno revelaram que o mesmo é capaz de funcionar como biomarcador da infecção, detetando de forma sensível e específica anticorpos IgM e IgG anti-*P. jirovecii* em amostras de soro de doentes (Tomás *et al.*, 2016). Assim, o mesmo antígeno foi aplicado neste estudo como ferramenta antigénica no desenvolvimento de uma ELISA para detecção de IgA secretória anti-*P. jirovecii* na saliva (uma amostra biológica de obtenção não invasiva).

#### **3.5.2 Protocolo do teste ELISA desenvolvido para detecção de IgA anti-*P. jirovecii* na saliva**

Foram utilizadas placas de ELISA com poços transparentes de fundo raso, aos quais foram adicionados 50 µL do antígeno recombinante com posterior incubação a 37°C, durante 50 minutos, nos poços ímpares (teste) e PBS 1x estéril nos poços pares (controlo). Seguidamente procedeu-se a uma lavagem com PBS para eliminação dos reagentes que não se ligaram. De seguida, foi realizado bloqueio de todos os poços com 50 µL de PBS-T 0,05% + PVA 0,1%, durante 45 minutos, à temperatura ambiente. Com o término do bloqueio, retirou-se o excesso de bloqueante sem se realizar qualquer lavagem. Foram adicionadas as salivas, onde poderiam estar presentes anticorpos contra o antígeno recombinante sintético, diluídas 1:5 em PBS-T e foram submetidas a incubação a 37°C, durante uma hora. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens com PBS-T e uma com água destilada. Seguidamente adicionou-se o conjugado, um anticorpo policlonal anti-IgA humana produzido em cabra (A0295, Sigma®) diluído 1:1000 em PBS-T, para que se desse o reconhecimento dos anticorpos anti-*P. jirovecii* que se tivessem ligado, ficando a incubar a

## Material e Métodos

37°C durante uma hora. Submeteu-se novamente a placa a três lavagens com PBS-T e uma vez com água destilada. Adicionou-se 50 µL de substrato da peroxidase em cada poço teste e controlo, seguida de incubação a 37°C, durante 30 minutos. A leitura da placa foi efetuada a 405 nm no leitor de microplacas *Infinite*® 200 Pro da Tecan ®.

### 3.6 Análise de Dados

A análise dos dados obtidos possibilitou a avaliação da aplicabilidade da técnica ELISA para detecção de IgA anti-*P. jirovevii* desenvolvida para o diagnóstico da PPC . Utilizou-se o teste do chi-quadrado ( $X^2$ ) e o teste exato de Fisher para estudar a associação entre duas variáveis qualitativas. O teste de *Mann-Whitney U* foi utilizado para determinar a diferença entre os níveis de anticorpos detetados pela técnica de ELISA quando comparadas duas categorias de indivíduos, e o teste *Kruskal-Wallis* substituiu o teste de *Mann-Whitney U* quando foram comparadas mais que duas categorias de indivíduos. Os testes estatísticos foram utilizados com um grau de confiança de 95 %, pelo que a rejeição da hipótese nula só foi possível em testes com valores de  $p$  inferiores a 0,05.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da amostragem

Para este estudo foram recolhidas amostras biológicas (secreções brônquicas, sangue e saliva) de 85 doentes com idade igual ou superior a 18 anos, com patologia pulmonar (admitidos no Centro Hospitalar Lisboa Ocidental. Todos os doentes envolvidos neste estudo provêm deste centro hospitalar, excetuando um doente que veio do Hospital do Litoral Alentejano. Os serviços de proveniência dos doentes envolvidos foram os de internamento de pneumologia, infeciologia, hematologia, cardiologia, nefrologia, medicina, consultas externas e urgência.

Dos 85 doentes participantes no estudo, somente foi possível recolher secreções brônquicas de 83, pelo que os dois doentes cujas secreções brônquicas não foram possíveis de obter, foram excluídos do estudo por impossibilidade da sua categorização face à infeção por *P. jirovecii*.

As idades dos 83 doentes envolvidos no estudo encontraram-se compreendidas entre os 31 e os 87 anos. Foi possível constatar que 51 doentes eram do sexo masculino e os restantes 32 doentes eram do sexo feminino.

No Quadro. 2 estão sistematizadas as informações obtidas no questionário referentes a dados laboratoriais e parâmetros clínicos. No Quadro. 3 está representado o estado de infeção por *P. jirovecii* em função do género.

## Resultados

Quadro. 2 Dados laboratoriais e parâmetros clínicos dos 83 doentes em estudo

Parâmetros clínicos	Número (%) de indivíduos
<b>Patologia de base</b>	
Doença autoimune	1 (1,2)
Bronquiectasias	2 (2,4)
Doença do interstício pulmonar	19 (22,9)
Neoplasia	34 (41,0)
Nódulo em estudo	13 (15,7)
Tuberculose	4 (4,8)
Pneumonia	4 (4,8)
VIH	1 (1,2)
VIH + pneumocistose	3 (3,6)
VIH + Pneumocistose + VHC	1 (1,2)
VIH + VHC + Tuberculose	1 (1,2)
<b>Exame microbiológico das amostras respiratórias</b>	
Negativo	60 (72,3)
Positivo (etiologia viral)	0 (0)
Positivo (etiologia bacteriana)	15 (18,1)
Positivo (etiologia micológica)	0 (0)
Inconclusivos	8 (9,6)
<b>Diagnóstico Clínico de PPc</b>	
Não compatível	79 (95,2)
Compatível	4 (4,8)
<b>Diagnóstico Laboratorial da PPc</b>	
IFI +	3 (3,6)
PCR +	25 (30,1)
<b>Carga Fúngica <sup>1</sup></b>	
Baixa	22 (26,5)
Moderada	0 (0)
Elevada	3 (3,6)
<b>Grupos de doentes</b>	
Caso de PPc	4 (4,8)
Infeção subclínica ou portador assintomático	21 (25,3)
Sem infeção por <i>P. jirovecii</i>	58 (69,9)

<sup>1</sup> Os critérios de semi-quantificação da carga fúngica pela técnica de IFI é baseado no número de formas quísticas de *P. jirovecii* por campo na ampliação x1000. A carga é considerada baixa quando detetadas 1-3 formas quísticas em 30 campos; moderada quando detetadas 4-30 formas quísticas em 30 campos; elevada quando detetadas 2 ou mais formas quísticas por campo (Costa *et al.*, 2005).

**Quadro. 3** *Categorização dos doentes nos grupos clínicos de interesse em função do género.*

Grupos de doentes	Género		Número total (%) de indivíduos
	Masculino	Feminino	
Caso de PPc	0 (0)	4 (4,8)	4 (4,8%)
Infeção subclínica ou portador assintomático	12 (14,5)	9 (10,8)	21 (25,3%)
Sem infeção por <i>P.jirovecii</i>	39 (47,0)	19 (22,9)	58 (69,9%)

## Resultados

### 4.2 Detecção de *Pneumocystis jirovecii* em espécimes pulmonares (secreções brônquicas) por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI-AcM)

Após o processamento das secreções brônquicas e realizada a técnica de IFI-AcM, detetou-se a presença de formas quísticas de *P. jirovecii* em três das 83 amostras o que corresponde a cerca de 3,6% dos doentes envolvidos no estudo. Todas as amostras positivas por IFI apresentaram carga fúngica elevada. Na Figura 4 está representado um campo de x400 e na Figura 5 um campo de x1000 da mesma amostra considerada positiva, que ilustram esta carga fúngica.

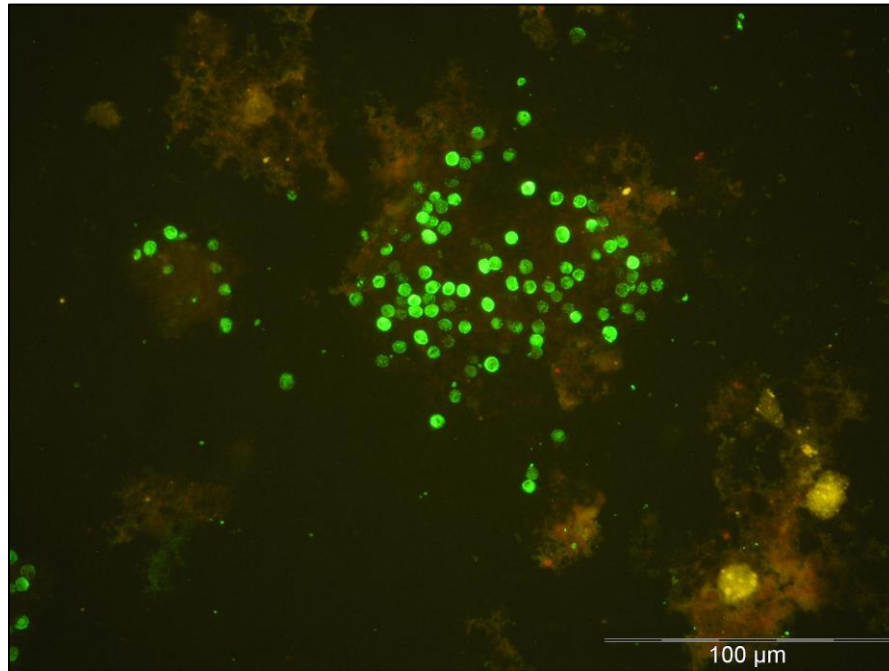


Figura 4. Agrupamentos de formas quísticas de *P. jirovecii* coradas por imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-*P. jirovecii* em secreções brônquicas de um doente em estudo, com ampliação de 400x.

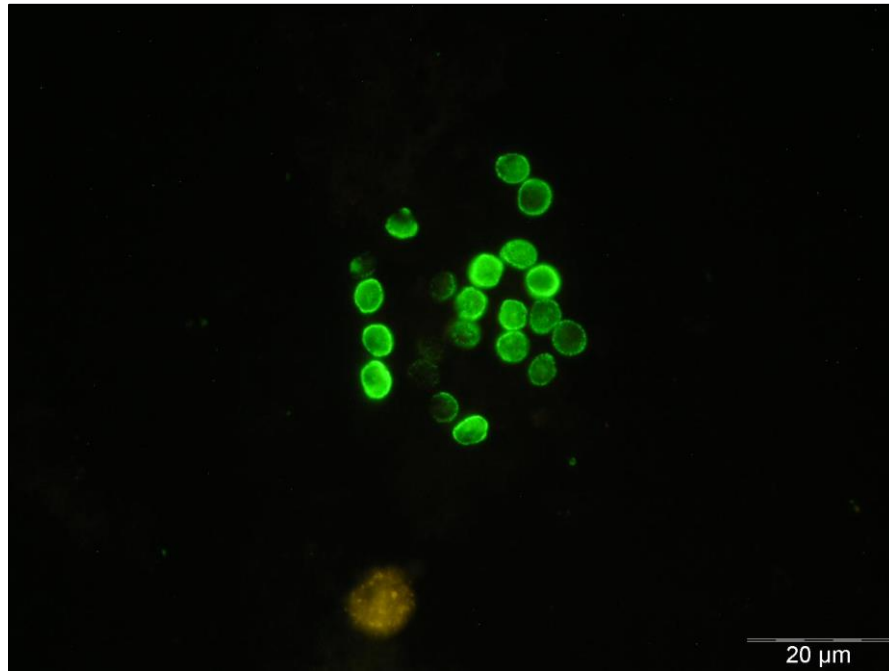


Figura 5. Agrupamento de formas quísticas de *P. jirovecii* coradas por imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-*P. jirovecii* em secreções brônquicas de um doente em estudo, com ampliação de 1000x.

## Resultados

### 4.3 Amplificação do gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii* por *nested-PCR*

Com vista ao diagnóstico laboratorial da infeção por *P. jirovecii*, foi realizada *nested-PCR* conforme protocolo descrito anteriormente. Esta técnica foi realizada em duplicado para todas as amostras e após realização da técnica de PCR, o ADN amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, de forma a avaliar os produtos obtidos resultantes da amplificação. Foram consideradas positivas para a presença de ADN genómico de *P. jirovecii* todas as amostras de doentes que apresentaram bandas únicas de interesse – 263 pares de bases (pb) como as representadas nas colunas 1, 3 e 4 da Figura 6.

As bandas com o tamanho do fragmento esperado foram excisadas do gel e recuperadas para posterior purificação e sequenciação, tendo todas elas revelado uma homologia superior a 99% com a sequência depositada do gene mtLSUrRNA de *P. jirovecii*.

Das 83 amostras estudadas, 25 (30,1%) foram consideradas positivas por PCR.

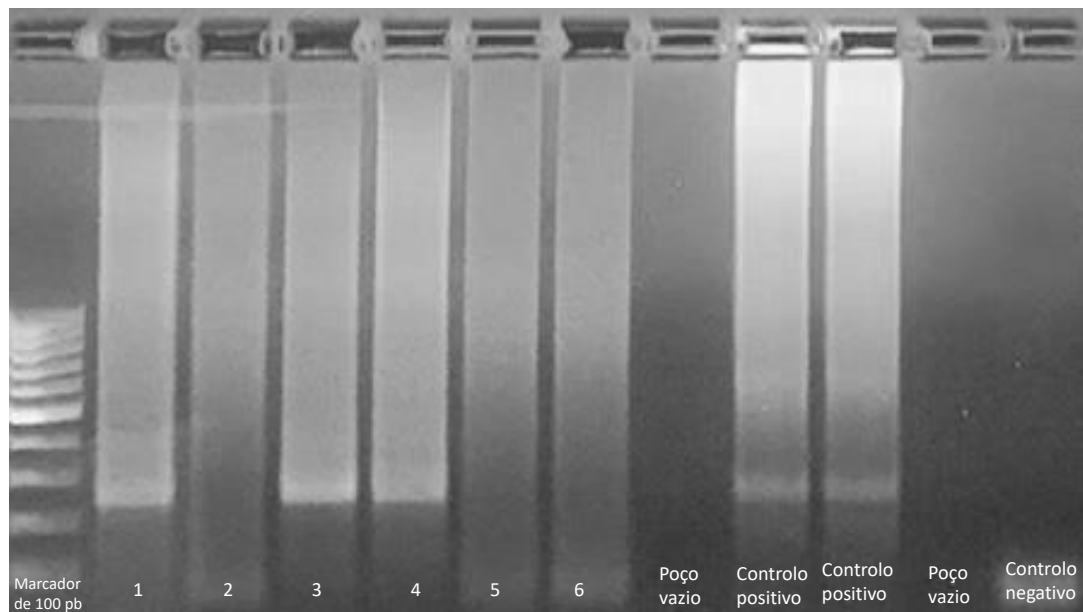
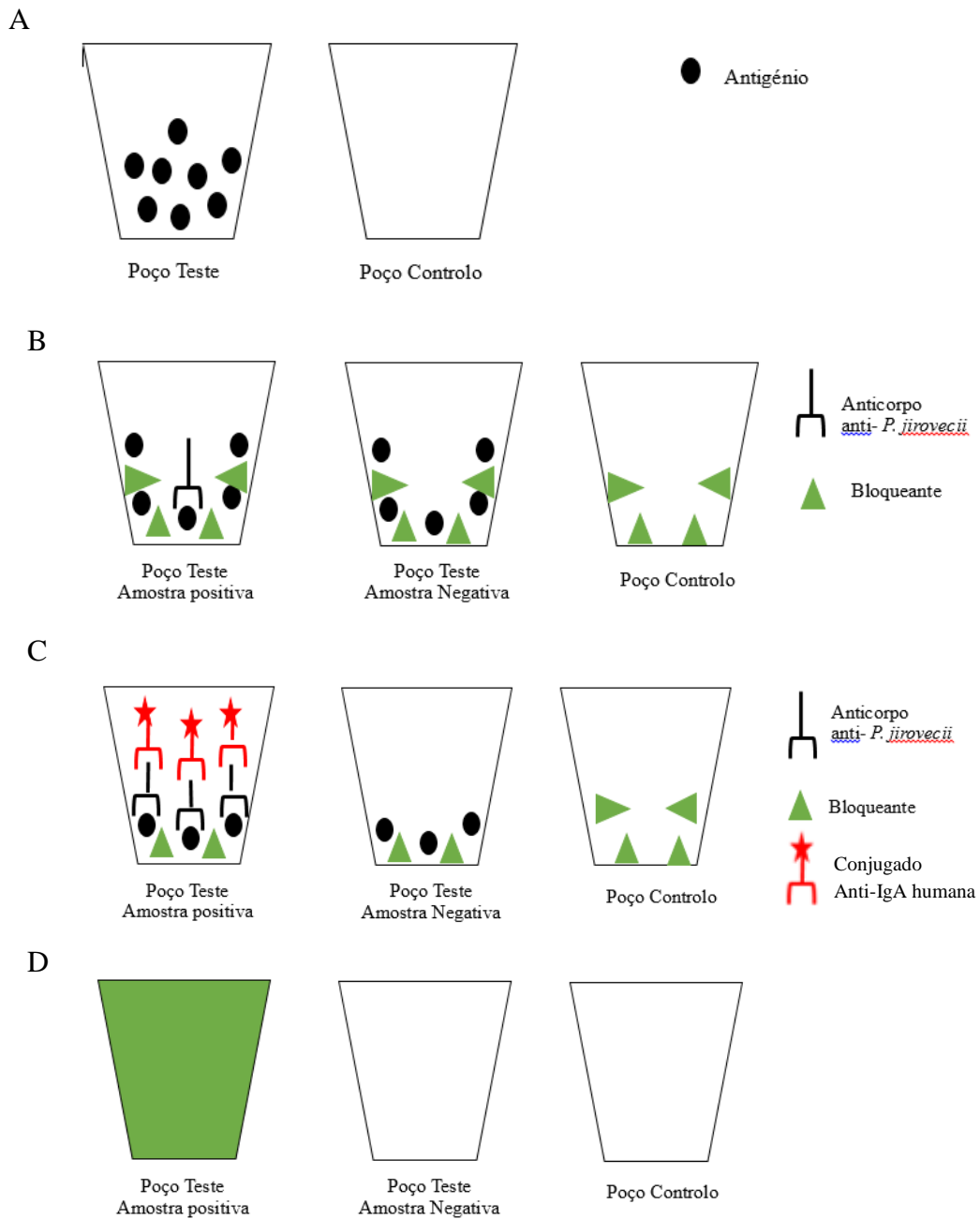


Figura 6. Gel de PCR de seis amostras de doentes (1-6), dois controlos positivos, um controlo negativo e um marcador de peso molecular de 100 pb.

#### 4.4 ELISA para deteção de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* em amostras de saliva

Com o intuito de compreender a eficácia da ELISA para deteção de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* em amostras de saliva, foram realizados os protocolos desenvolvidos nas amostras de saliva dos 83 doentes envolvidos neste projeto. A Figura 7 ilustra o fundamento desta técnica.



## Resultados

Figura 7. Ilustração do fundamento da técnica de ELISA para detecção de anticorpos da classe IgA anti-*P. jirovecii*. A - Ilustração do revestimento dos poços teste da placa ELISA com o antigénio sintético multiepítipo de *P. jirovecii* e a ausência de revestimento dos poços controlo. B - Após serem realizadas lavagens e ter sido executado o bloqueio dos poços da placa de ELISA, com posterior eliminação do excesso deste bloqueante, foram aplicadas as amostras de saliva. Se estas possuírem anticorpos anti-*P. jirovecii*, estes reconhecerão o antigénio sintético multiepítipo de *P. jirovecii*, estabelecendo ligação. C - De seguida adiciona-se o conjugado para detecção de anticorpos humanos da classe IgA, que reconhecerão os anticorpos da classe IgA anti-*P. jirovecii* que se tenham ligado ao antigénio sintético multiepítipo de *P. jirovecii*. D – Por último, adiciona-se o substrato que ao ser degradado pela peroxidase existente nos conjugados, emite uma coloração esverdeada, no caso de positividade da amostra.

A título de exemplo, na Figura 8 está apresentada uma placa de ELISA, com amostras testadas em duplicado, cujos poços com emissão de cor verde traduzem positividade.

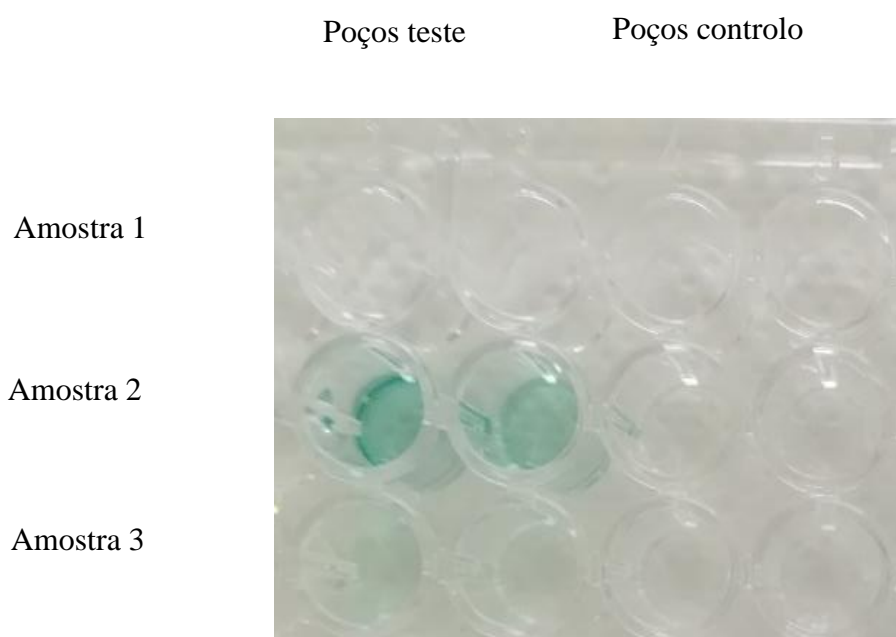


Figura 8. Representação de uma placa de ELISA com estudo de três amostras, em duplicado, em poços teste e poços controlo. A presença de cor verde nos poços teste da amostra 2, indica positividade para a detecção de anticorpos da classe IgA anti-*P. jirovecii* nesta amostra. A ausência de cor nos poços controlo, valida a técnica.

#### 4.5 Análise estatística dos dados obtidos

Com vista a analisar os dados obtidos, foram realizados gráficos do tipo *boxplot* para facilitar a visualização e retirar conclusões acerca das mesmas.

A Figura 9 representa o nível de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* detetados nas diferentes categorias de indivíduos estudados. Para se poder comparar as medianas das categorias dos indivíduos analisados, efetuou-se o teste não paramétrico *Mann-Whitney U*, tendo-se assumido um nível de significância de 5%. Verificou-se que a mediana dos níveis de IgA anti-*P. jirovecii* foi de 0,0449 nos doentes com PPc, 0,0744 nos doentes colonizados e 0,0538 nos doentes sem infeção por *P. jirovecii*. Sendo que a diferença entre as medianas não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

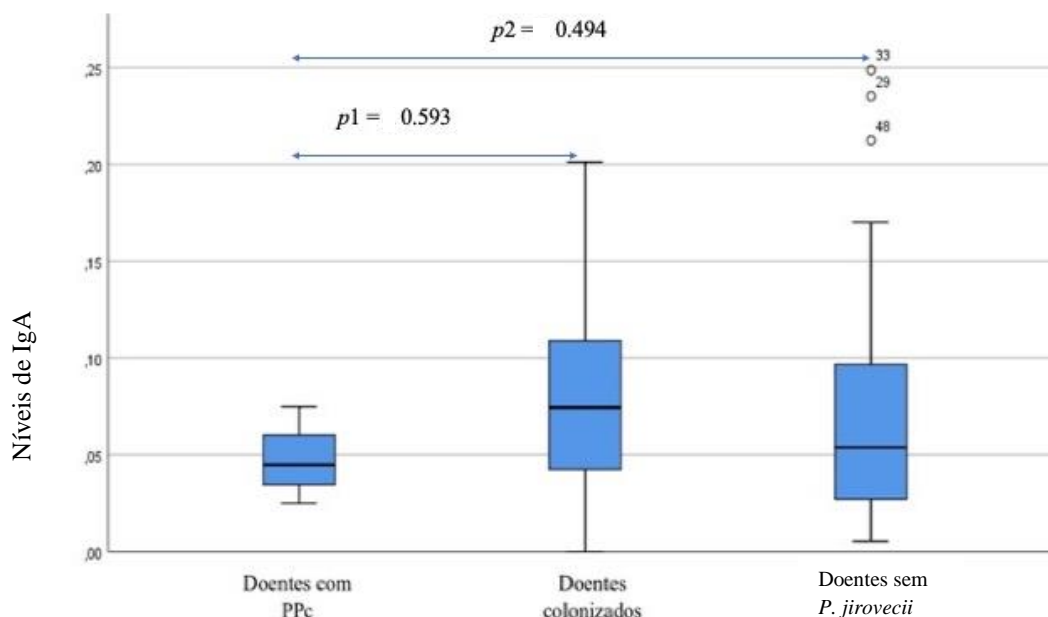


Figura 9. Diagrama de extremos e quartis com representação dos valores dos testes ELISA para deteção de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii*, obtidos nas categorias de doentes com PPc, doentes sem *P. jirovecii* e doentes colonizados.

## Resultados

Na Figura 10 estão representados os níveis de IgA anti-*P. jirovecii* dos doentes estudados, agrupados segundo a presença ou ausência de infeção por *P. jirovecii*. Verificou-se que a mediana nos doentes com infeção foi de 0,0743 e dos doentes sem infeção foi de 0,0538. Contudo, a diferença entre a medianas não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

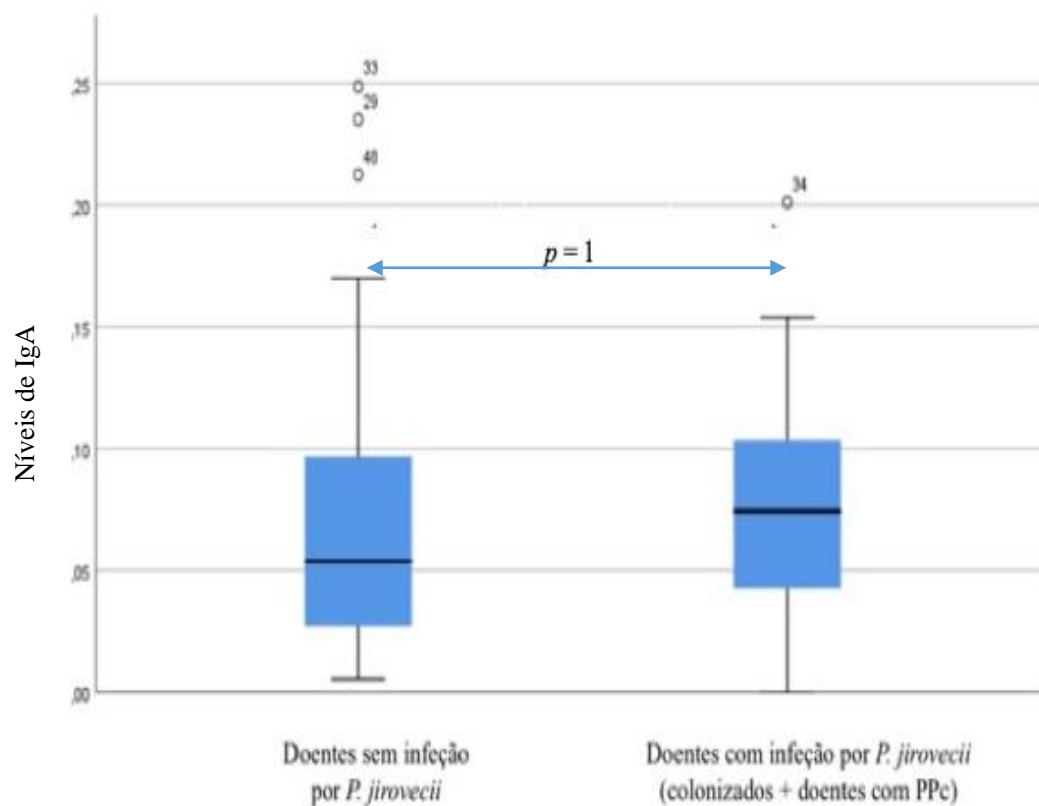


Figura 10. Diagrama de extremos e quartis com representação dos valores dos testes ELISA para deteção de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* contrastando as categorias de doentes sem infeção por *P. jirovecii* e os doentes com infeção por *P. jirovecii*.

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

*P. jirovecii* é um fungo patogénico oportunista com tropismo para o pulmão humano que causa, em regra, pneumonia intersticial grave, conhecida por pneumocistose ou PPc, em indivíduos imunocomprometidos. A PPc destaca-se pela sua relevância no contexto da infeção por vírus da imunodeficiência humana/síndrome de imunodeficiência adquirida (VIH/Sida). Contudo, o número crescente de doentes sob terapêuticas imunossupressoras para tumores, transplante de órgãos e doenças autoimunes, tem tornado a PPc um problema de saúde também emergente nestas populações (Hughes, 2005; Esteves *et al.*, 2014, Matos & Esteves, 2016).

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da PPc depende da recolha de espécimes respiratórios obtidos por técnicas invasivas e da sua avaliação por técnicas morosas e onerosas como colorações citoquímicas, imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI-AcM) e técnicas de biologia molecular (PCR) (Esteves *et al.*, 2014; Matos & Esteves, 2016, Tomás & Matos, 2018). Adicionalmente, a sua realização está dependente de profissionais qualificados, instalações e equipamentos dispendiosos assim como de tempos de execução elevados) (Harris *et al.*, 2011; Esteves *et al.*, 2014; Matos & Esteves, 2016; Tomás & Matos, 2018). Os espécimes respiratórios utilizados, de entre os quais o lavado broncoalveolar é considerado o *gold standard*, requerem a realização de uma técnica invasiva para a sua colheita, como a broncofibroscopia, que acarreta riscos e é de difícil execução em doentes com insuficiência respiratória ou em idade pediátrica (Tomás & Matos, 2018).

Este estudo teve como objetivos principais avaliar o potencial diagnóstico das IgA anti-*P. jirovecii* presentes na saliva dos doentes para, seguidamente, aplicá-las no desenvolvimento de um teste imunoenzimático alternativo de diagnóstico da PPc que seja sensível, específico e executável em espécimes biológicos de fácil acesso, de obtenção pouco onerosa e não invasiva, como a saliva. Assim, neste estudo, foi avaliado um universo de 83 doentes com patologia ou suspeita de patologia pulmonar que recorreram ao serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, com indicação médica para execução de broncofibroscopia, para avaliação de uma alternativa de diagnóstico da PPc. Esta foi a população escolhida pois estes são doentes com predominância de patologias

imunossupressoras (doença oncológica, doenças autoimunes, doenças do interstício pulmonar) e, conseqüentemente, são doentes mais propensos a desenvolver PPc. Em todos estes doentes, foram recolhidas amostras de secreções brônquicas, para diagnóstico padrão da PPc (Matos *et al.*, 2017; Tomás & Matos, 2018), e amostras de saliva para desenvolvimento de uma técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii*. O diagnóstico padrão da PPc foi feito através da execução da técnica de IFI-AcM e nested-PCR às secreções brônquicas recolhidas de cada doente. Os dados clínicos e laboratoriais da população analisada estão representados no quadro 2 onde podemos ver que, apesar de uma alta percentagem de doentes oncológicos ou com suspeita de neoplasia (56,7%) e de uma alta percentagem de doentes com alterações no interstício pulmonar (22,9%), somente se verificou a ocorrência de casos de PPc ativa em quatro dos 83 doentes analisados, o que corresponde a 4,8% da população. Todos estes quatro doentes tinham como patologia de base a infeção por VIH sendo que um deles apresentava também infeção por vírus da hepatite B (VHC). Sendo a infeção por *P. jirovecii*, ainda nos dias de hoje, a principal doença definidora de sida em Portugal (Martins & Aldir, 2018), a presença de PPc nestes doentes era já expectável, pois a multiplicação do microrganismo ocorre de forma mais rápida e constante nesta tipologia de doentes. A presença de uma carga fúngica elevada em todos estes doentes, vem corroborar o anteriormente exposto (vide Figura 4 e Figura 5).

Contudo, esperávamos detetar mais casos desta patologia na população estudada. Em 25 doentes, foi possível detetar a presença de ADN de *P. jirovecii* por *nested-PCR*, nas suas secreções brônquicas. Destes 25 doentes, quatro apresentavam doença activa (PPc). Nos restantes 21 doentes não existia clínica sugestiva desta patologia. Quando o ADN de *P. jirovecii* é detetado, sem existência de clínica ou achados radiológicos compatíveis com PPc, deve considerar-se que estamos perante casos de colonização ou infeção subclínica (Alanio *et al.*, 2017). Assim, neste estudo observou-se que uma percentagem bastante significativa da população estudada (25.3%) apresenta colonização por *P. jirovecii*. Assim, sabendo que a maior parte destes doentes tem uma patologia de base que causa imunossupressão, a deteção de infeção por este microrganismo tem especial relevância na monitorização do doente, para que seja clinicamente avaliada a necessidade de instituição de profilaxia adequada. Isto porque, embora estes doentes não tenham clínica sugestiva de PPc, têm *P. jirovecii* nos seus

pulmões, o que aliado à sua patologia de base, acarreta um risco acrescido para o desenvolvimento de PPc (infecção ativa), com consequente lesão do parênquima pulmonar (Alanio *et al.*, 2017).

Relativamente ao exame microbiológico das amostras respiratórias em estudo, foi possível obter-se informação de 90,4% (75) dos doentes, já que nos restantes 9.6% (8) as amostras se encontravam contaminadas, tendo o resultado do exame saído como inconclusivo. O exame foi dado como negativo em 72.3% (60) dos doentes, não foram detetadas infeções de etiologia viral ou fúngica, e 18.1% (15) dos doentes apresentaram infeções de etiologia bacteriana. Assim, não foi possível constituir um grupo de doentes com outras patologias de etiologia fúngica, o que impossibilitou a avaliação da especificidade da técnica desenvolvida para o diagnóstico diferencial da PPc de outras patologias fúngicas (Tomás *et al.*, 2016).

De notar, que os quatro doentes com diagnóstico laboratorial e clínico compatível com infecção ativa (PPc), são todos do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 34 e os 52 anos e infetados por VIH, tal como se pode constatar no Quadro. 3.

Tendo em consideração as desvantagens inerentes às técnicas laboratoriais de referência, o número crescente de casos de indivíduos colonizados e a gravidade que esta pneumonia pode assumir, surge a necessidade de se direcionarem esforços para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico mais rápido, menos dispendioso e com utilização de espécimes biológicos obtidos de forma não invasiva. Consequentemente, surge o interesse na pesquisa de anticorpos anti- *P. jirovecii* em amostras biológicas de obtenção não invasiva. Em diversas áreas, têm sido desenvolvidas pesquisas em torno do potencial diagnóstico da saliva enquanto amostra biológica de obtenção mais fácil, assim como já estão disponíveis alguns estudos que sustentam a utilização desta tipologia de amostra no diagnóstico de doenças neoplásicas, autoimunes, do foro endocrinológico, entre outras (Bezerra de Moura *et al.*, 2007).

As imunoglobulinas presentes na saliva são das classes IgM, IgG, e IgA, contudo a que predomina neste fluido é esta última que é um anticorpo produzido pelo nosso organismo predominantemente em secreções do trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário (Parry *et al.*, 1989; Bosqui *et al.*, 2015). Nas amostras salivares, 10% das proteínas existentes são imunoglobulinas, das quais 87% são da classe IgA (Borges *et al.*, 2004). No caso da IgA secretória, na saliva, esta deriva de plasmócitos existentes nas glândulas salivares,

## Discussão e Conclusões

representando o principal mecanismo específico de resposta imunológica local (Bezerra de Moura *et al.*, 2007). Sendo a PPc uma patologia que afeta os pulmões, a pesquisa de anticorpos anti-*P. jirovecii* da classe IgA em espécimes biológicos de obtenção não invasiva, como a saliva, surge como uma alternativa ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico desta doença (Bosqui *et al.*, 2015).

Embora ainda existam algumas lacunas no conhecimento acerca dos anticorpos salivares devido ao facto das suas concentrações serem mais baixas do que as detetadas no plasma (0,014 mg.mL<sup>-1</sup> *versus* 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> para a IgG e 0,19 mg.mL<sup>-1</sup> *versus* 2,2 mg.mL<sup>-1</sup> para a IgA), a sua aplicabilidade no diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas deve ser explorada (Plomp *et al.*, 2018).

Estudos da resposta imunológica com base na glicoproteína major de superfície (MSG) de *P. jirovecii*, a principal proteína antigénica de superfície específica de *Pneumocystis*, têm revelado que esta proteína é uma ferramenta promissora para ser utilizada em estudos serológicos para deteção da infeção por *P. jirovecii* (Stringer *et al.*, 2007). Anteriormente, o Grupo de investigação em Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do IHMT produziu e patenteou um antígeno recombinante sintético desta proteína, específico de *P. jirovecii*, o qual mostrou capacidade de detetar, de forma sensível e específica, anticorpos IgM e IgG anti-*P. jirovecii* em amostras de soro (Tomás *et al.*, 2016). Tal, evidenciou a sua aplicabilidade como biomarcador de infeção por *P. jirovecii*, razão pela qual foi utilizado neste estudo como ferramenta antigénica da ELISA desenvolvida. Com a produção da ferramenta antigénica referida anteriormente por parte destes investigadores, considerámos interessante avaliar a sua aplicabilidade no desenvolvimento de um teste de diagnóstico da PPc baseado na deteção de IgA anti-*P. jirovecii* presente na saliva e, desse modo, explorar as vantagens existentes nesta amostra biológica. O carácter inovador deste estudo consiste na junção de tecnologias de produção de antígenos sintéticos de *P. jirovecii* com métodos clássicos de deteção de anticorpos, para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico da PPc pouco moroso, oneroso e capaz de recorrer a espécimes biológicos de obtenção não invasiva, como a saliva. Os objetivos principais deste estudo foram determinar o valor diagnóstico das IgA anti-*P. jirovecii* presentes na saliva e aplicá-los no desenvolvimento de uma nova plataforma de diagnóstico da PPc.

A técnica desenvolvida trata-se de uma ELISA indireta onde são utilizados conjugados capazes de detetar anticorpos humanos da classe IgA presentes nas amostras de saliva de doentes que tenham estabelecido ligação ao antígeno adsorvido na placa. Tendo em conta os grupos clínicos de doentes existentes, eram esperados níveis mais elevados de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* na saliva dos doentes com PPc, seguidos pelos doentes com infeção assintomática por *P. jirovecii* (colonizados), e por último os doentes considerados sem infeção por *P. jirovecii*. Também, seriam esperadas diferenças na distribuição dos níveis de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* entre doentes com infeção por *P. jirovecii* e doentes sem infeção. Contudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de doentes avaliados (figura 9), pelo que os níveis de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* detetáveis nos doentes com PPc não são estatisticamente diferentes dos níveis de anticorpos detetáveis nos outros grupos de doentes. De notar que somente 4.8% da população avaliada neste estudo (83 doentes) corresponde a doentes com PPc, sendo que todos eram VIH positivos com baixa contagem de células T CD4<sup>+</sup> (< 50 células por mm<sup>3</sup>). Com a diminuição dos níveis de células T CD4<sup>+</sup>, consecutivamente existe uma diminuição da quantidade e qualidade dos anticorpos produzidos, podendo este fator ter afetado os resultados esperados neste projeto.

Apesar de os níveis médios de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* serem tendencialmente superiores em doentes com infeção por *P. jirovecii* (figura 10), a diferença para os valores dos doentes sem infeção não é, também, estatisticamente significativa.

Os resultados obtidos não nos permitem concluir que a IgA secretória é uma boa ferramenta de diagnóstico para a PPc. Contudo, verificámos que os títulos médios de anticorpos IgA anti-*P. jirovecii* são superiores nos doentes com infeção por *P. jirovecii* comparativamente aos doentes sem infeção. Assim, a confirmação da aplicabilidade e potencial da IgA secretória no diagnóstico da PPc, com base na técnica de ELISA desenvolvida, deve ser repetida num estudo com uma amostragem mais equilibrada entre as categorias de doentes. Assim, como trabalho futuro para investigadores na área, fica em aberto a exploração desta amostra biológica e desta técnica de ELISA como eventuais instrumentos a aplicar num diagnóstico que beneficiará os doentes e contribuirá para uma melhoria do controlo clínico da doença.



## 6. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2015) *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 23-47.

Alanio, A. and Bretagne, S. (2017) *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us?. *F1000Research*, 6, p. 739.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walzer, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*. 5<sup>th</sup> edition. Garland Science, p. 1-193.

Aliouat-Denis, C.M., Martinez, A., Aliouat, el M., Pottier, M., Gantois, N., Dei-Cas, E. (2009) The *Pneumocystis* life cycle. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), p. 419-426.

Bava, A.J., Cattaneo, S. & Bellegarde, E. (2002) Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44 (5), p. 279-282.

Bezerra de Moura, S.A., Costa de Medeiros, A.M., da Costa, F.R.H., de Moraes, P.H., & Alves de Oliveira Filho, S. (2007). Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 7(2).

Bhagwat, S.P., Gigliotti, F., Wang, J., Wang, Z., Notter, R.H., Murphy, P.S., Rivera-Escalera, F., Malone, J., Jordan, M.B., Elliott, M.R., Wright, T.W. (2018) Intrinsic Programming of Alveolar Macrophages for Protective Antifungal Innate Immunity Against *Pneumocystis* Infection. *Frontiers in immunology*, 9:2131, p. 1–15.

Blount, R.J., Daly, K.R., Fong, S., Chang, E., Grieco, K., Greene, M., Stone, S., Balmes, J., Miller, R.F., Walzer, P.D., Huang, L. (2017) Effects of clinical and environmental factors on

## Bibliografia

bronchoalveolar antibody responses to *Pneumocystis jirovecii*: A prospective cohort study of HIV+ patients. *Plos One*, 12(7), p e0180212.

Borges, A.S., & Figueiredo, J.F.D.C. (2004). Detecção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* no soro, líquido e saliva de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e neurotoxoplasmose. *Arquivo Neuropsiquiatria*, 62(4), 1033-1037.

Bosqui, L.R., Gonçalves, A.L., Gonçalves-Pires, M.R., Custodio, L.A., de Menezes, M.C., Murad, V.A., de Paula, F.M., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., Costa-Cruz, J.M., Costa, I.N. (2015) Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. *Acta Tropica*, 150, p. 190-195.

Calderón, E.J., Gutiérrez-rivero, S., Durand-joly, I., Dei-cas, E. (2010) *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(6), p. 683-701.

Calderón-sandubete, E.J., de Armas Rodriguez, Y., Capó de Paz, V. (2011) *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia, *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63(2), p. 97–116.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218

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. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 37(10), 766-771.

de Souza, W. & Benchimol, M. (2005) Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100 (8). p. 903-908.

Delanoe, P. (1912). Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. *CR Acad. Sci. Paris*, 155, 658-660. Esteves, F., Antunes, F., & Matos, O. (2014). *Pneumocystis* e pneumocistose: o agente patogénico e a doença. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 10(1), p. 16-22.

Fein, A., Grossman, R., Ost, D., Talwar, A., Merwin, S. (2006) Diagnosis and Management of Pneumonia and Other Respiratory Infections. 2nd edition. Professional Communications, p. 9-12.

Gingo, M.R., Lucht, L., Daly, K.R., Djawe, K., Palella, F.J., Abraham, A.G., Bream, J.H., Witt, M.D., Kingsley, L.A., Norris, K.A., Walzer, P.D. & Morris, A. (2011) Serologic responses to *Pneumocystis* proteins in human immunodeficiency virus patients with and without *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 57 (3). p. 190-196.

Grilo, V. and Pereira, A. (2016) *Pneumocystis* Pneumonia in 107 HIV Infected Patients Admitted to the Department of Infectious Diseases at Santa Maria Hospital, Lisbon (2002 - 2013)]. *Acta Medica Portuguesa*, 29(10), p. 639–650.

Harris, J.R., Marston, B.J., Sangrue, N., DuPlessis, D., Park, B. (2011) Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for *Pneumocystis* pneumonia (PCP). *PLoS One*, 6(8):e23158.

Hughes, W.T. (2005) *Pneumocystis* pneumonitis in non-HIV-infected patients: update. In: Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis* Pneumonia (3ª edição). Marcel Dekker Inc., USA., p.407-434.

## Bibliografia

Kelly, M.N. & Shellito, J.E. (2010) Current understanding of *Pneumocystis* immunology. *Future microbiology*. 5 (1). p. 43-65.

Kutty, G., Shroff, R. and Kovacs, A. (2013) Characterization of *Pneumocystis* Major Surface Glycoprotein Gene (msg) promoter activity in *Saccharomyces cerevisiae*, 12(10), p. 1349–1355.

Lautenschlager, I., Lyytikäinen, O., Jokipii, L., Jokipii, A., Maiche, A., Ruutu, T., Tukiainen, P. & Ruutu, P. (1996) Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *Journal of clinical microbiology*. 34 (3). p. 728-730.

Martins, H.C. & Aldir, I. (2018) Infecção VIH e SIDA: a situação em Portugal a 31 de Dezembro de 2017.

Matos O, Esteves F (2016) Laboratory diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. In: Kon K, Rai M. Microbiology of respiratory system infection. Elsevier, p. 185-210.

Matos O, Tomás AL, Antunes F. (2017) *Pneumocystis jirovecii* and PcP. In: Current Progress in Medical Mycology. Cham: Springer International Publishing, p. 215-254.

Morris, A., Lundgren, J.D., Masur, K., Walzer, P.D., Hanson, D.L., Frederick, T., Huang, L., Beard, C.B. & Kaplan, J.E. (2004) Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerging infectious diseases*. 10 (10). p. 1713-1720.

Parry, J.V., Perry, K.R., Mortimer, P.P., & Panday, S. (1989). Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. *Journal of medical virology*, 28(4), 255-260.

Plomp, R., de Haan, N., Bondt, A., Murli, J., Dotz, V., & Wuhrer, M. (2018). Comparative Glycomics of Immunoglobulin A and G From Saliva and Plasma Reveals Biomarker Potential. *Frontiers in immunology*, 9, 2436.

Schildgen, V., Mai, S., Khalfaoui, S., Lusebrink, J., Pieper, M., Tillmann, R.L., Brockmann, M., Schildgen, O. (2014) *Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. *MBio*, 5(3):e01186-14.

Skalski, J.H., Kottom, T.J., & Limper, A.H. (2015) Pathobiology of *Pneumocystis pneumonia*: life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS yeast research*, 15(6).

Sokulska, M., Kicia, M., Wesołowska, M., & Hendrich, A. B. (2015). *Pneumocystis jirovecii*—from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitology research*, 114(10), p. 3577-3585.

Stringer, J.R. (2005) Surface Antigens. In: Walzer, P. & Cushion, M. (eds.). *Pneumocystis Pneumonia*. Third Edition Volume 194 p(95-126). New York: Marcel Dekker. p. 95-126.

Stringer, J.R. (2007) Antigenic variation in *Pneumocystis*. *The journal of eukaryotic microbiology*, 54(1), p. 8-13.

Tomás, A. L., Cardoso, F., Esteves, F., & Matos, O. (2016). Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Scientific reports*, 6, 36287.

Tomás, A.L. & Matos, O. (2018) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: current advances in laboratory diagnosis. *OBM genetics*, 2(4).

## Bibliografia

Tomio, D., Maurici, R. & Silva, D. (2005) Pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*: aspectos clínicos, radiológicos e laboratoriais, *Arquivos Catarinenses de Medicina*, 34(4), pp. 59–59.

Wakefield, A.E., Pixley, F.J., Banerji, S., Sinclair, K., Miller, R.F., Moxon, E.R. & Hopkin, J.M. (1990) Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*. 336 (8713).

## Bibliografia

Walzer, P.D. (1999). Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 6 (2). p. 149-155.

Wright, T.W., Gigliotti, F., Finkelstein, J.N., McBride, J.T., An, C.L., & Harmsen, A.G. (1999). Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *The Journal of clinical investigation*, 104(9), 1307-1317.

## 7. ANEXOS

### I. Consentimento Informado



### **Novas abordagens de diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc): potencial diagnóstico dos anticorpos IgA específicos na saliva**

Instituições participantes: Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de<sup>2</sup> Lisboa (UNL) / Hospital de Egas Moniz (HEM), Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (CHLO)

#### **INFORMAÇÕES A DAR AO DOENTE PARA PARTICIPAR NO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO**

Investigador Principal do projeto – Enfermeira Ana Cláudia Cardita

#### **INTRODUÇÃO:**

Antes de dar o seu consentimento para participar neste estudo, deverá ser informado(a) do propósito, benefícios, riscos, desconforto e precauções desta investigação. Se não pretender participar neste estudo, deverá ser informado dos exames laboratoriais, alternativos, existentes.

A sua participação neste estudo é voluntária, sem qualquer benefício proveniente do estudo. Em qualquer momento, pode desistir de participar no estudo, sem que seja prejudicado no seu seguimento médico.

Toda a informação que nos fornecer será confidencial.

#### **QUEM É QUE NÃO DEVE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?**

Pessoas com menos de 18 anos.

---

Nota: Este documento é feito em duas vias: uma para o processo e outra para ficar na posse de quem consente

QUANTO TEMPO DURA A SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

A sua participação resume-se a uma visita.

PORQUE É QUE ESTA INVESTIGAÇÃO ESTÁ A DECORRER?

*Pneumocystis* é um microrganismo causador de pneumonia (PPc ou pneumocistose) em imunocomprometidos, com relevância emergente nos doentes VIH negativos com alguma doença pulmonar. O diagnóstico laboratorial atual da PPc depende da obtenção de amostras respiratórias por técnicas invasivas e da sua avaliação por técnicas morosas e onerosas como técnicas de coloração citoquímica, imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais e PCR.

Assim, o objetivo principal deste estudo é determinar o valor diagnóstico dos anticorpos da classe IgA anti-*Pneumocystis* no diagnóstico da PPc.

QUEM É RESPONSÁVEL PELO ESTUDO?

Trata-se de um estudo que envolve duas instituições (HEM – Serviço de Pneumologia e IHMT) e que será conduzido no IHMT pela investigadora principal, Ana Cláudia Cardita, com o apoio da Professora Doutora Olga Matos.

QUANTOS DOENTES PARTICIPARÃO NO ESTUDO?

Cerca de 120 doentes.

O QUE É QUE LHE É PEDIDO?

Será recolhido de cada doente uma amostra de secreções brônquicas, de saliva e de sangue. As amostras serão devidamente identificadas e guardadas para estudo posterior. A colheita só será feita no contexto da recolha de amostras para outros exames necessários no âmbito dos cuidados médicos habituais a prestar aos doentes.

QUAIS OS BENEFÍCIOS QUE TERÁ POR PARTICIPAR NO ESTUDO?

Não terá benefícios directos, por participar no estudo. Indirectamente, ajudará a esclarecer várias dúvidas relativas à melhoria dos métodos de diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis*.

SE NÃO QUISER PARTICIPAR OU SE QUISER DESISTIR A MEIO DO ESTUDO SERÁ DE ALGUM MODO, PREJUDICADO?

Se não quiser<sup>3</sup> ou se quiser desistir a meio do estudo nunca será prejudicado, nem no seu atendimento, nem no seu tratamento.

---

Nota: Este documento é feito em duas vias: uma para o processo e outra para ficar na posse de quem consente

TERÁ ALGUMA DESPESA EXTRA POR PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Não, não terá nenhuns custos acrescentados por participar no estudo que lhe é proposto.

A SUA PARTICIPAÇÃO SERÁ PAGA?

A sua participação no estudo não será paga.

Nº da célula profissional/ nº mecanográfico do médico

---

SE TIVER QUAISQUER DÚVIDAS, E SE AS QUISER ESCLARECER, CONTACTE:

A ENF. ANA CLÁUDIA CARDITA, HEM – 918410310

O DR. FERNANDO NOGUEIRA, DIRETOR DA PNEUMOLOGIA, HEM - 968089431

---

Nota: Este documento é feito em duas vias: uma para o processo e outra para ficar na posse de quem consente

## CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_

autorizo que o meu material colhido (secreções brônquicas, saliva e sangue) seja utilizado para o estudo de um marcador serológico da infeção por *Pneumocystis jirovecii*.

Todos os meus dados pessoais se manterão dentro da mais estrita confidencialidade.

Ass (utente) \_\_\_\_\_

Ass (representante legal do doente) \_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

Nota: Este documento é feito em duas vias: uma para o processo e outra para ficar na posse de quem consente

## II. Aprovação da Comissão de Ética do CHLO para a Saúde



Comissão de Ética para a Saúde

N.º Registo no RNEC: 20170700050

### PARECER

Projeto de Mestrado,

Título: “Novas abordagens de diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPC): potencial diagnóstico dos anticorpos IgA específicos na saliva”

Investigadora Principal: **Enf.ª Cláudia G. Cardita** (Discente no Mestrado em Ciências Biomédicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa | Enfermeira no Serviço de Pneumologia do CHLO-HEM)

Serviços onde decorrerá o estudo: **Serviço de Pneumologia do CHLO » HEM | Unidade de Parasitologia Médica – Laboratórios do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários » Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)**

Após reunião de 4 de setembro de 2017 e no seguimento da receção do modelo de Consentimento Informado e Questionário retificados, estando atualmente o estudo de acordo com as normas de submissão impostas por esta CES, deliberou-se emitir **parecer favorável** à realização do mesmo.

Lembramos que, de acordo com a Deliberação da CNPD n.º 1704/2015, qualquer estudo que envolva dados de doentes deverá ter a aprovação da Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPD).

A Comissão de Ética para a Saúde solicita à Investigadora Principal que, quando da conclusão deste estudo, lhe seja enviada uma síntese dos resultados e conclusões do mesmo.

Ouvido o Relator, o processo foi votado pelos Membros da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental presentes em reunião de 4 de setembro de 2017:

Presidente: Prof.ª Doutora Maria Teresa Marques

Dr. Carlos Costa, Enf.ª Clara Carvalho, Dra. Helena Farinha,

Dr. José Santana Carlos, Dra. Paula Peixe, Dr. Rui Campante Teles e Padre João Valente

Pelo exposto, emitiu-se a 27 de setembro de 2017, **parecer favorável**.

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde

Prof.ª Doutora Maria Teresa Marques

MARIA TERESA MARQUES

Presidente da Comissão  
de Ética para a Saúde

Comissão de Ética para a Saúde (CES) do CHLO  
Hospital de Egas Moniz | Rua da Junqueira, 126 - 1349-019 Lisboa  
Telefone: 210 432 665 | Correio eletrónico: anavalho@chlo.min-saude.pt



### III. Aprovação da Comissão Nacional de Proteção de Dados



Proc. n.º 17358/ 2017 | 1

#### Autorização n.º 11800/ 2017

Instituto de Higiene e Medicina Tropical , NIPC 501559094, notificou à Comissão Nacional de Protecção de Dados (CNPd) um tratamento de dados pessoais com a finalidade de realizar um Estudo Clínico sem Intervenção, denominado Novas abordagens de diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc): potencial diagnóstico dos anticorpos IgA específicos na saliva .

O participante é identificado por um código especificamente criado para este estudo, constituído de modo a não permitir a imediata identificação do titular dos dados; designadamente, não são utilizados códigos que coincidam com os números de identificação, iniciais do nome, data de nascimento, número de telefone, ou resultem de uma composição simples desse tipo de dados. A chave da codificação só é conhecida do(s) investigador(es).

É recolhido o consentimento expresso do participante ou do seu representante legal.

A informação é recolhida indiretamente do processo clínico.

As eventuais transmissões de informação são efetuadas por referência ao código do participante, sendo, nessa medida, anónimas para o destinatário.

A CNPD já se pronunciou na Deliberação n.º 1704/2015 sobre o enquadramento legal, os fundamentos de legitimidade, os princípios aplicáveis para o correto cumprimento da Lei n.º 67/98, de 26 de outubro, alterada pela Lei n.º 103/2015, de 24 de agosto, doravante LPD, bem como sobre as condições e limites aplicáveis ao tratamento de dados efetuados para a finalidade de investigação clínica.

No caso em apreço, o tratamento objeto da notificação enquadra-se no âmbito daquela deliberação e o responsável declara expressamente que cumpre os limites e condições aplicáveis por força da LPD e da Lei n.º 21/2014, de 16 de abril, alterada pela Lei n.º 73/2015, de 27 de junho – Lei da Investigação Clínica –, explicitados na Deliberação n.º 1704/2015.

O fundamento de legitimidade é o consentimento do titular.



A informação tratada é recolhida de forma lícita, para finalidade determinada, explícita e legítima e não é excessiva – cf. alíneas a), b) e c) do n.º 1 do artigo 5.º da LPD.

Assim, nos termos das disposições conjugadas do n.º 2 do artigo 7.º, da alínea a) do n.º 1 do artigo 28.º e do artigo 30.º da LPD, bem como do n.º 3 do artigo 1.º e do n.º 9 do artigo 16.º ambos da Lei de Investigação Clínica, com as condições e limites explicitados na Deliberação da CNPD n.º 1704/2015, que aqui se dão por reproduzidos, autoriza-se o presente tratamento de dados pessoais nos seguintes termos:

Responsável – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Finalidade – Estudo Clínico sem Intervenção, denominado Novas abordagens de diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc): potencial diagnóstico dos anticorpos IgA específicos na saliva

Categoria de dados pessoais tratados – Código do participante; idade/data de nascimento; género; dados da história clínica; dados de meios complementares de diagnóstico; medicação prévia concomitante

Exercício do direito de acesso – Através dos investigadores, por escrito

Comunicações, interconexões e fluxos transfronteiriços de dados pessoais identificáveis no destinatário – Não existem

Prazo máximo de conservação dos dados – A chave que produziu o código que permite a identificação indireta do titular dos dados deve ser eliminada 5 anos após o fim do estudo.

Da LPD e da Lei de Investigação Clínica, nos termos e condições fixados na presente Autorização e desenvolvidos na Deliberação da CNPD n.º 1704/2015, resultam obrigações que o responsável tem de cumprir. Destas deve dar conhecimento a todos os que intervenham no tratamento de dados pessoais.

Lisboa, 20-10-2017

Proc. n.º 17358/ 2017 | 3



A Presidente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Filipa Calvão'. The signature is fluid and cursive, with the first letter 'F' being particularly prominent.

Filipa Calvão



## IV. Aprovação da Comissão de Ética do IHMT

Exma. Sra. Dra. Ana Cláudia Cardita,

Conforme informação constante na página web do Conselho de Ética, "...O CEIHMT, na sua reunião de dia 30 de março de 2016, aprovou por unanimidade não deverem ser considerados para apreciação projetos que tenham obrigatoriamente que ser apreciados por comissões congéneres de outras instituições ou países. O mesmo Conselho manifestou, no entanto, a sua vontade de ser informado sobre esses pedidos de parecer e respetiva decisão, para poder dar continuidade à reflexão sobre o trabalho dos Conselhos de ética, contribuir para a sua articulação com os Conselhos congéneres e apoiar os investigadores do IHMT."

Assim, Encarrega-me a Sra. Presidente do Conselho de Ética do IHMT, Professora Doutora Filomena Pereira, de informar V. Exa. que tendo já Parecer Favorável da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospital Lisboa Ocidental, o CE não emitirá um segundo Parecer.

No entanto, sugere-se que se efetue uma pequena alteração ao protocolo colocando nas considerações éticas uma menção ao período máximo de conservação das amostras, em alinhamento com o parecer da CNPD.

Com os meus melhores cumprimentos,

Celeste Figueiredo, Coordenadora Técnica  
Gabinete de Apoio aos Conselhos do IHMT  
*Global Health and Tropical Medicine*

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Universidade NOVA de Lisboa  
Rua da Junqueira n.º 100 | 1349-008 Lisboa  
+351 213 652 626  
[www.ihmt.unl.pt](http://www.ihmt.unl.pt) | [facebook](#) | [youtube](#)





## V. Ficha de Dados Clínicos



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

### Novas abordagens de diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*: potencial diagnóstico dos anticorpos IgA específicos na saliva

#### Questionário

Data ___/___/___	Nº Processo Clínico
Número do estudo: _____	

#### Dados Pessoais

Idade: ____	Género: M • F •
VIH _____	Outros _____ Qual _____
Serviço: _____	Hospital: _____

#### Produto biológico a analisar

LBA \_\_\_\_\_ / Sec. brônquicas \_\_\_\_\_ / Saliva \_\_\_\_\_ / Sangue \_\_\_\_\_

#### Dados Clínicos/Terapêuticos

<p><b>Diagnóstico clínico:</b></p> <p>Suspeita de PPC: tosse não produtiva •, febre •, dispneia •</p> <p>Outros • Quais? _____</p>
--

