



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde



Culminação de Estudos II

Frequência de *Pneumocystis jirovecii* em Pacientes com Sarcoma de Kaposi Atendidos no Hospital Central de Maputo entre 2016 e 2019

Autora: Tivânia Cardial Chissico



Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas
Licenciatura em Biologia e Saúde
Culminação de Estudos II



**Frequência de *Pneumocystis jirovecii* em Pacientes com Sarcoma de Kaposi Atendidos
no Hospital Central de Maputo entre 2016 e 2019**

Autora: Tivânia Cardial Chissico

Supervisores: Dr. Alfeu Passanduca

Prof. Dr. José Sumbana

Prof.^a Doutora Elizabete Nunes

Maputo, Dezembro de 2024

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me conceder saúde, força e determinação para não desanimar durante os todos meus anos de estudos.

A minha profunda gratidão endereço aos meus queridos pais, por não terem medido esforços para me dar uma educação sólida, sempre com amor, carinho e conselhos valiosos. O apoio incondicional e sacrifício que me deram ao longo desta trajetória será sempre a minha fonte de inspiração.

Aos meus irmãos, especialmente, Beticleusa e Etiandra, agradeço pelo suporte e por acreditarem em mim. E ao meu irmão Cristiano João e minha cunhada Lurdes Dzimba, obrigada de coração pelo acolhimento e por todo suporte.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, que através do projecto MozSkills financiou a aquisição de materiais e reagentes para a realização desta pesquisa, muito obrigada!

Gostaria de expressar a minha sincera gratidão aos meus supervisores, Alfeu Passanduca e José Sumbana, pelos valiosos ensinamentos, orientação, paciência e apoio incondicional ao longo desta jornada. Não poderia ter chegado até aqui sem vocês. Agradeço também a Professora Elizabeth Nunes, por me aceitar e permitir que eu fizesse parte deste projecto de estudo.

Aos colaboradores do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane pelo acolhimento, apoio constante e acompanhamento durante a realização deste estudo, meu mais sincero obrigada. Um agradecimento especial a Esménia João e Marília Sufiana por estarem sempre prontas a me ajudar, compartilhando seus conhecimentos e por todo o suporte durante o processamento das amostras.

Às minhas amigas, Denisy Renato e Clionédia Anibal, minha gratidão por estarem sempre ao meu lado nos momentos sérios e também nos momentos de descontração. A vossa amizade e apoio incondicional fizeram toda diferença nesta trajetória. Agradeço especialmente as minhas companheiras do laboratório, Ivete Samuel e Agar Matsinhe por todo carinho, suporte, conselhos e pelos “puxões de orelhas” que tantas vezes foram necessários para que pudesse concluir o trabalho com sucesso.

Por fim, agradeço a todos que directa ou indirectamente apoiaram-me nesta jornada.

Declaração de Honra

Eu, Tivânia Cardial Chissico, declaro sob compromisso de honra, que o presente trabalho académico intitulado “Frequência de *Pneumocystis jirovecii* em Pacientes com Sarcoma de Kaposi Atendidos no Hospital Central de Maputo entre 2016 e 2019” foi realizado por mim, de forma individual e original, não tendo recorrido a fontes ou meios ilícitos, salvo as devidamente citadas no corpo do trabalho. Declaro ainda que cumpro todas as normas éticas e académicas exigidas pela Universidade Eduardo Modlane para a realização deste trabalho.

Maputo, 06 de Dezembro de 2024

Tivânia Cardial Chissico

(Tivânia Cardial Chissico)

Dedicatória

Dedico este trabalho, à minha mãe, Albertina Nassone, por ser meu pilar, minha inspiração e meu maior incentivo. Sem seu apoio incansável, este sonho jamais teria sido concretizado.

Resumo

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) é um fungo oportunista que frequentemente causa pneumonia em pacientes imunossuprimidos, principalmente com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e recebendo corticoides sistêmicos, podendo estar associada ao Sarcoma de Kaposi (SK). Nos países de alta renda, a incidência de infecção por *P. jirovecii* e Sarcoma de Kaposi diminuiu significativamente devido à administração de tratamento antirretroviral e profilaxia com cotrimoxazol. Em contraste, na África Subsaariana, incluindo Moçambique, a prevalência destas infecções continua elevada, tendo atingido uma frequência de 20% em 2017. Este estudo descreve a frequência de *P. jirovecii* em pacientes com SK infectados pelo HIV atendidos no Hospital Central de Maputo entre 2016 e 2019.

O estudo foi do tipo transversal descritivo de carácter retrospectivo, onde foram incluídas amostras de Lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi e HIV+, guardadas no biobanco do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina. A detecção molecular de *P. jirovecii* foi realizada utilizando a técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase *nested* do gene que codifica a subunidade grande do ARN ribossomal mitocondrial com peso molecular de 346 pares de base. A análise estatística descritiva das variáveis foi realizada no programa Microsoft Office Excel 2013 através da elaboração de tabelas e gráficos de frequência.

Um total de 145 amostras de LBA foram incluídas no estudo, das quais 16 (11%) foram positivas para *P. jirovecii*. A maior frequência de colonização por *P. jirovecii* foi observada em indivíduos do sexo masculino 9 (56,3%), particularmente na faixa etária dos 30 a 44 anos 13 (81,3%). A contagem das células CD4 mostrou que 5 (31,3%) dos pacientes eram de baixo risco e 2 (12,5%) de alto risco. Todos os pacientes estavam colonizados e/ou com infecção assintomática por *P. jirovecii*.

O estudo revela casos de colonização por *P. jirovecii* em pacientes com SK e com infecção pelo HIV, reforçando a necessidade do diagnóstico desta micose pulmonar para reduzir o seu impacto no país.

PALAVRAS-CHAVES: *Pneumocysts jirovecii*, Sarcoma de Kaposi, Vírus da Imunodeficiência Humana, Hospital Central de Maputo.

Índice Geral

Índice de Tabelas.....	x
Índice de Figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Lista de Unidades.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Problema.....	3
1.2. Justificativa.....	4
2. Objectivos.....	5
2.1. Objectivo geral.....	5
2.2. Objectivos específicos.....	5
3. Referencial teórico.....	6
3.1. Classificação e Taxonomia do <i>P. jirovecii</i>	6
3.2. Morfologia e Ciclo de vida do <i>P. jirovecii</i>	7
3.3. Pneumonia por <i>P. jirovecii</i>	9
3.4. Transmissão e Colonização do <i>P. jirovecii</i>	10
3.5. Métodos de diagnóstico da pneumonia por <i>P. jirovecii</i>	11
3.5.1. Diagnóstico citológico.....	12
3.5.2. Imunofluorescência.....	12
3.5.3. Métodos sorológicos.....	13
3.5.4. Métodos moleculares.....	14
3.6. Tratamento e Profilaxia da pneumonia por <i>P. jirovecii</i>	15

3.6.1.	Tratamento da pneumonia por <i>P. jirovecii</i>	15
3.6.2.	Profilaxia da pneumonia por <i>P. jirovecii</i>	16
3.7.	Sarcoma de Kaposi.....	16
3.8.	Epidemiologia da pneumonia por <i>P. jirovecii</i> e Sarcoma de Kaposi	17
4.	Área de estudo	20
5.	Metodologia	21
5.1.	Tipo de estudo.....	21
5.2.	População e Amostragem	21
5.2.1.	Critérios de inclusão	21
5.2.2.	Critérios de exclusão	21
5.3.	Tipo e Variáveis do estudo	21
5.4.	Materiais e Equipamentos	22
5.5.	Extracção de DNA	23
5.6.	Detecção molecular do <i>P. jirovecii</i>	24
5.6.1.	PCR do gene <i>mtLSU rRNA</i>	24
5.6.2.	Electroforese em gel de agarose.....	26
5.6.3.	Visualização do produto da PCR.....	27
5.7.	Considerações éticas	27
5.8.	Análise de dados	28
6.	Resultados	29
6.1.	Características clínico-demográficas dos participantes do estudo	29
6.2.	Frequência de <i>P. jirovecii</i> em pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi e HIV+	30

6.2.1.Relacção entre as características clínico-demográficas e a colonização por <i>P. jirovecii</i>	31
7. Discussão	33
7.1.Frequência de <i>P. jirovecii</i> em pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi e HIV+	33
7.2.Relacção entre as características clínico-demográficas e a colonização por <i>P. jirovecii</i>	33
8. Conclusão.....	37
9. Limitações.....	38
10. Recomendações	39
11. Referências bibliográficas	40
12. Anexos	48

Índice de Tabelas

Tabela 1: Materiais e equipamentos utilizados no estudo.....	22
Tabela 2: Sequências dos iniciadores utilizados na amplificação do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> por <i>nested</i> PCR.....	25
Tabela 3: Mastermix do gene <i>mtLSU rRNA</i>	25
Tabela 4: Condições térmicas aplicadas na <i>nested</i> PCR para amplificação específica do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i>	26
Tabela 5: Características clínico-demográficas dos pacientes com Sarcoma de Kaposi e HIV+ incluídos no estudo.....	29

Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>P. jirovecii</i> no alveólo pulmonar.....	8
Figura 2: Mapa da localização geográfica do Hospital Central de Maputo.	20
Figura 3: Electroforese em gel de agarose (1,5%) em TAE para detecção do fragmento do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial (<i>mtLSU rRNA</i>).	30
Figura 4: Frequência dos pacientes colonizados por <i>P. jirovecii</i> por faixa etária.	31
Figura 5: Frequência de pacientes em risco de colonização por <i>P. jirovecii</i>	32

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BG	(1,3)-Beta-D-Glucano
BSA	Bovine serum albumin
CTZ	Cotrimoxazol
HCM	Hospital Central de Maputo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
KSHV/HHV8	Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi ou herpevírus humano-8
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Lactato Desidrogenase
LM-FM	Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina
<i>mtLSU rRNA</i>	Subunidade grande do RNA ribossomal mitocondrial
<i>P. jirovecii</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
PCP	Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
SK	Sarcoma de Kaposi
SMX	Sulfametoxazol
TAE	Tris-Acetato-EDTA
CD4	Grupo de diferenciação 4
TARV	Terapia Antirretroviral
TMP	Trimetoprim
UV	Ultravioleta

Lista de Unidades

μg	microgramas
μl	microlitros
μM	micromolares
kg	quilogramas
mg	miligramas
ml	mililitros
pb	pares de base
rpm	rotações por minutos

1. Introdução

Pneumocystis jirovecii (*P. jirovecii*) é um agente patogénico oportunista, que causa pneumonia intersticial grave, conhecida por pneumonia por *P. jirovecii* (PCP), que ocorre geralmente em indivíduos com comprometimento imunitário. Os principais factores de risco incluem doentes infectados pelo HIV no estado avançado da doença, receptores de transplantes de órgãos sólidos, pacientes com neoplasia, com imunodeficiências congénitas e submetidos a terapias imunossupressoras (Esteves *et al.*, 2016; Alanio & Bretagne, 2017; Meenakshi *et al.*, 2019).

A PCP manifesta-se clinicamente com tosse não produtiva, febre baixa, dor torácica, arrepios, fadiga e hipoxemia acentuada. A evolução da doença em indivíduos infectados por HIV tem início insidioso e o quadro agrava-se gradualmente, enquanto em doentes não infectados pelo HIV a doença tem início súbito e rápida evolução (Lanaspa *et al.*, 2015; Meenakshi *et al.*, 2019; Bateman *et al.*, 2020; Wills *et al.*, 2021).

A PCP é uma infecção que ocorre como comorbilidade em doenças infecciosas ou neoplásicas, como o Sarcoma de Kaposi (SK). O SK é um tumor linfo-angioproliferativo multicêntrico, mesenquimal e de baixo grau, causado pelo herpesvírus associado ao SK (KSHV), que como a PCP, afecta preferencialmente indivíduos imunocomprometidos (Cesarman *et al.*, 2019; Micali *et al.*, 2022).

O SK apresenta quatro variantes clínicas: o SK clássico, que afecta principalmente as extremidades de pacientes idosos e segue geralmente um curso crónico indolente; o SK Africano ou endémico; o SK associado à imunossupressão e o SK associado à SIDA (Micali *et al.*, 2022). O SK epidémico ou associado ao SIDA é uma das formas mais graves da doença e, é fatal sem tratamento, ocorrendo maioritariamente na África subsaariana, onde a infecção por KSHV é prevalente devido à transmissão pela saliva durante a infância (Kasturia *et al.*, 2017; Cesarman *et al.*, 2019).

No início dos anos 80, do século passado, a incidência da PCP e SK alterou-se de forma drástica, passando de doenças raras a comuns. A sua ocorrência entre homens homossexuais e utilizadores de drogas intravenosas foi uma das primeiras evidências da epidemia por HIV, onde eram consideradas doenças definidoras do SIDA (Masur *et al.*, 1981; Kasturia *et al.*, 2017; Cesarman *et al.*, 2019).

Em simultâneo, foi relatada a comorbilidade entre as duas doenças, com uma prevalência de cerca de 50% (Burkes *et al.*, 1985; Lemlich *et al.*, 1987; Mitchel *et al.*, 1992; Pozniak *et al.*, 1992; Malin *et al.*, 1995).

Actualmente, em países desenvolvidos, a incidência de PCP e SK diminuiu drasticamente entre os pacientes com imunodepressão moderada-grave devido ao Tratamento Antirretroviral Altamente Ativa (TARV) e a profilaxia com o cotrimoxazol (CTZ). Contudo, na África Subsariana, onde reside a maior parte das pessoas infectadas pelo HIV, cerca de 23 milhões de pessoas tem acesso limitado a estes tratamentos (Taylor *et al.*, 2012; Lanaspá *et al.*, 2015; Kasturia *et al.*, 2017; Willis *et al.*, 2021).

Após o pico da epidemia do HIV/SIDA, houve um substancial decréscimo de estudos sobre a comorbilidade da PCP e SK a nível mundial. Apesar disso, as pesquisas realizadas na África Subsariana continuam a documentar a prevalência da comorbilidade da PCP e SK, variando de 2% a 15% (Yoo *et al.*, 2005; Hartung *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012; Chiliza *et al.*, 2018). Em Moçambique, a comorbilidade foi relatada em 20% de pacientes adultos com SK e HIV+ no Hospital Central de Maputo (HCM) (Vilanculo, 2017).

Actualmente, não existe um sistema de cultivo para *P. jirovecii*, portanto, o diagnóstico baseia-se na combinação de sintomas clínicos, achados radiográficos e observação microscópica de cistos em lâminas sujeitas a coloração por metilamina prata ou por imunofluorescência. A amostra “padrão-ouro” para o diagnóstico da PCP é o lavado broncoalveolar, no entanto, outras amostras como expetoração, lavado orofaríngeo, aspiração endotraqueal e nasofaríngeo são igualmente úteis para o diagnóstico (Meenakshi *et al.*, 2019; Bateman *et al.*, 2020).

O diagnóstico microscópico de *P. jirovecii*, apesar de ser o método de confirmação, tem baixa acurácia diagnóstica quando comparada à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), principalmente em amostras menos invasivas como aspirado nasofaríngeo (Meenakshi *et al.*, 2019; Bateman *et al.*, 2020; Wills *et al.*, 2021).

A PCR para detecção de *P. jirovecii* inclui a *nested* PCR que emprega um procedimento robusto e altamente sensível para amplificar selectivamente regiões específicas do DNA alvo, fundamentando-se em duas etapas consecutivas de amplificação, cada uma utilizando um conjunto distinto de iniciadores, os quais são direccionados para um gene multicópia presente no genoma de *P. jirovecii* (Esteves, 2010).

As regiões genómicas comumente amplificadas através desta técnica são o espaçador internamente transcrito (ITS), a subunidade grande do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*), a subunidade menor do rRNA mitocondrial, a região conservada dos genes da família das glicoproteínas *major* de superfície, o dihidrofolato redutase e a proteína de choque térmico. No entanto, o gene *mtLSU rRNA* demonstra ter maior sensibilidade, sendo o marcador preferencial no diagnóstico molecular da PCP (Song *et al.*, 2016).

Diante deste contexto, este estudo pretende determinar a frequência de *Pneumocystis jirovecii* em pacientes com Sarcoma de Kaposi atendidos no HCM entre 2016 e 2019, através da PCR, de modo a propor uma vigilância mais activa desta infecção em Moçambique.

1.1. Problema

Um estudo de revisão sistemática e meta-análise sobre a prevalência de *P. jirovecii* na África Subsaariana entre 1995 e 2020 reportou 19% (9% colonização) em adultos infectados pelo HIV (Willis *et al.*, 2021). Além disso, a prevalência da PCP em adultos na região varia consideravelmente, com taxas de 43% na África do Sul, 39% em Uganda, 37% no Quênia, 33% no Zimbábue, 27% no Malawi e 7,5% na Tanzânia (Chakaya *et al.*, 2003; Moris *et al.*, 2004; Kibiki *et al.*, 2007; Hartung *et al.*, 2011).

Durante a epidemia do HIV/SIDA nos Estados Unidos da América, a PCP emergiu como uma das principais comorbidades em pacientes diagnosticados com SK, atingindo cerca de 7% a 50% dos pacientes (Burkes *et al.*, 1985; Lemlich *et al.*, 1987; Mitchel *et al.*, 1992). Na África Subsaariana, durante o mesmo período, esta comorbidade foi observada em 14% a 33% dos pacientes estudados (Downing *et al.*, 1984; Pozniak *et al.*, 1992; Malin *et al.*, 1995).

Actualmente, estudos realizados na África Subsaariana em pacientes adultos com SK atendidos em hospitais públicos revelaram uma prevalência que variou de 2% a 15% de *P. jirovecii* (Yoo *et al.*, 2005; Hartung *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012; Chiliza *et al.*, 2018).

Em Moçambique, estima-se que a prevalência de PCP em adultos seja de 16,3%, enquanto em crianças com imunodeficiência avançada a prevalência é de 9,2% (Sarcarlal e Dewing, 2016).

Ademais, dados preliminares do estudo principal, no qual o presente estudo está inserido, revelaram alguns doentes adultos infectados pelo HIV admitidos com SK e com diagnóstico positivo de PCP (Vilanculo, 2017). Neste contexto, o presente estudo pretende responder a

seguinte pergunta de pesquisa: **Qual é a frequência de *P. jirovecii* em pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi atendidos no Hospital Central de Maputo?**

1.2. Justificativa

As infecções fúngicas, incluído a PCP, respondem uma elevada morbidade e mortalidade mundialmente, tornando-se uma preocupação crescente no cenário clínico e epidemiológico, devido ao aumento de indivíduos em risco de desenvolvimento destas doenças nomeadamente, imunodepressão, neoplasia e terapia intensiva (OMS, 2022).

A prevalência contínua do HIV/SIDA em Moçambique é um desafio significativo devido ao difícil acesso ao tratamento antirretroviral e a profilaxia com cotrimoxazol, resultando em uma população substancialmente susceptível a doenças oportunistas, como a PCP e SK. Estas condições podem ocorrer frequentemente de forma concomitante, aumentando o risco de mortalidade neste grupo de pacientes.

No entanto, apesar da crescente preocupação, estas infecções recebem pouca atenção e recursos, levando a lacunas na pesquisa epidemiológica que descreve especificamente a comorbilidade PCP/SK a nível mundial, limitando a compreensão da frequência e das suas características. Em Moçambique, estudos realizados no HCM, unidade de referência no país, para onde esses casos são enviados, demonstraram taxas significativas desta condição, sugerindo que pode constituir um importante problema de saúde pública.

Diante dessa realidade, este estudo justifica-se pela necessidade de compreender a dinâmica desta comorbilidade em doentes HIV+ em Moçambique, de modo a orientar as decisões de prevenção, diagnóstico precoce, tratamento e melhorar os resultados clínicos. Como também, fornecer bases para formulação de políticas de saúde mais eficazes e direcionadas para pacientes coinfectados com HIV, SK e PCP em Moçambique.

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral

Analisar a ocorrência de *P. jirovecii* em pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi atendidos no Hospital Central de Maputo entre 2016 e 2019.

2.2. Objectivos específicos

- ◆ Descrever as características clínico-demográficas dos pacientes.
- ◆ Determinar a frequência de *P. jirovecii* em pacientes com Sarcoma de Kaposi.
- ◆ Relacionar as características clínico-demográficas com a infecção por *P. jirovecii*.

3. Referencial teórico

3.1. Classificação e Taxonomia do *P. jirovecii*

Pneumocystis jirovecii é um microrganismo, patógeno oportunista que coloniza os mamíferos, incluindo os seres humanos causando pneumonia intersticial grave, denominada pneumocistose ou pneumonia por *P. jirovecii* (PCP) em indivíduos imunocomprometidos. A descoberta inicial desse patógeno remonta a década de 1909, durante o estudo da tripanossomíase, onde Carlos Chagas, em Minas Gerais, no Brasil através da observação microscópica das estruturas císticas em tecido extrapulmonar em cobaias. Na época, Chagas erroneamente interpretou essas estruturas como parte do ciclo de vida do *Trypanosoma Cruzi* (Chagas, 1909).

Em 1910, António Carini encontrou estruturas císticas semelhantes em ratos infectados pelo *Trypanosoma lewisi* e enviou uma amostra para os pesquisadores Pierre e Marie Delanöe, investigadores do Instituto Pauster de Paris. Os Delanöe, durante suas investigações, encontraram estruturas císticas semelhantes em ratos de rua sem qualquer evidência de infecção por *Trypanosoma*, levando-os a suspeitar que se tratava de um novo microrganismo (Delanoë e Delanoë, 1912).

Em 1912, os Delanöe classificaram formalmente o microrganismo, como sendo distinto de *T. cruzi*, atribuindo-lhe a designação de *Pneumocystis carinii*. O nome “Pneumo” foi atribuído devido ao tropismo do microrganismo pelos pulmões, “cystis” em referência à forma cística característica, e o restritivo específico “carinii” em homenagem a António Carini, que disponibilizou amostras cruciais para a pesquisa (Delanoë e Delanoë, 1912).

Até a década de 1980, *Pneumocystis* spp. era considerado um protozoário, baseado em várias características, nomeadamente: morfologia semelhante aos protozoários e patogênese no hospedeiro, ausência de características morfológicas típicas dos fungos, resistência aos antifúngicos convencionais e sensibilidade aos antiprotozoários (Vera & Ruenda, 2021).

A natureza fúngica foi confirmada em 1988, após análises de RNA ribossômico conduzidas por Edmar e Stringer, classificando-o como um Ascomyceto, apesar da deficiência de ergosterol em sua membrana celular, uma característica comum entre os fungos (Vera & Ruenda, 2021; Weyant *et al.*, 2021).

Actualmente, o género *Pneumocystis* spp., tem a seguinte classificação taxonómica:

- ◆ Domínio: Eukaryota
- ◆ Reino: Fungi
- ◆ Sub-reino: Dikarya
- ◆ Filo: Ascomycota
- ◆ Sub Filo: Taphrinomycotina
- ◆ Classe: Pneumocystidomycetes
- ◆ Subclasse: Pneumocystidomycetidae
- ◆ Ordem: Pneumocystidales
- ◆ Família: Pneumocystidaceae (Readhead, 2006; Weyant *et al.*, 2021).

Estudos serológicos e análises moleculares demonstram que as diferentes espécies do género *Pneumocystis* variam fenotipicamente e geneticamente conforme o hospedeiro que infectam. Com base nisto, foi inicialmente proposto um sistema trinominal para a classificação das espécies, onde microrganismos provenientes de hospedeiros diferentes foram designados como *formae speciales* de *P. carinii* (Aliouat-Denis *et al.*, 2009; Vera & Ruenda, 2021).

Em 1999 foi revista a taxonomia e reclassificaram a anterior espécie que infecta os seres humanos de *P. carinii f. sp. hominis* para *P. jirovecii*, em homenagem ao parasitologista checo Otto Jirovec, o primeiro investigador a descrever a presença deste microrganismo em humanos (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Vera & Ruenda, 2021).

3.2. Morfologia e Ciclo de vida do *P. jirovecii*

O ciclo de vida de *P. jirovecii* tem sido difícil de compreender completamente devido à falta de um meio cultivo *in vitro* fiável para o seu isolamento. Consequentemente, as teorias sobre o ciclo de vida baseiam-se em micrografias de microscopia electrónica de transmissão, reconstruções tridimensionais de organismos de *Pneumocystis* em tecidos de mamíferos infectados e inferências fundamentadas em dados moleculares (Skalski *et al.*, 2015).

São reconhecidos três estágios morfológicos do ciclo de vida de *P. jirovecii*: o trofozoíto ou forma trófica, o pré-cisto ou esporocisto e o cisto ou esporo, divididos em duas fases: assexuada e sexuada (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Skalski *et al.*, 2015; Vera & Ruenda, 2021; Weyant *et al.*, 2021) (Fig. 1).

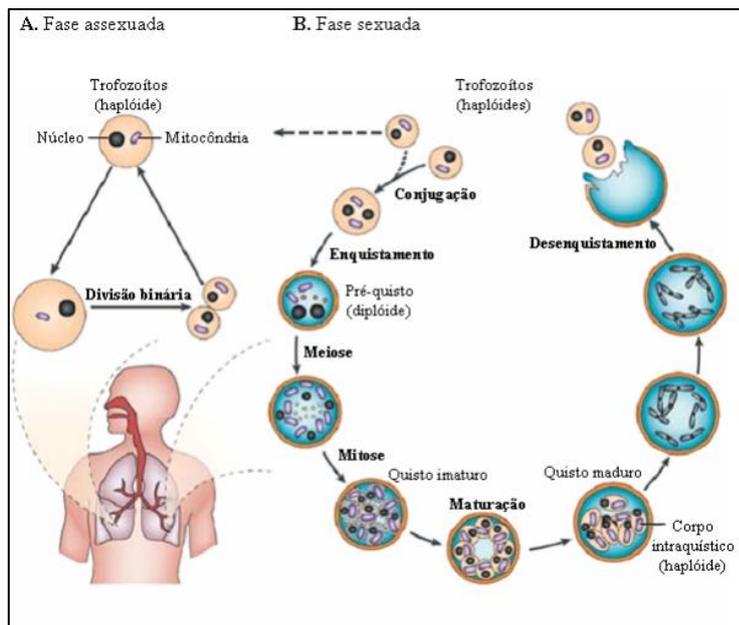


Figura 1: Ciclo de vida de *P. jirovecii* no alveólo pulmonar. São descritos três estágios morfológicos de *P. jirovecii*: trofozoítos, pré-cisto e cisto (quisto). É evidenciada a reprodução assexuada (A) das formas tróficas haploides que dividem-se por fissão binária. Na fase de reprodução sexuada do ciclo de vida (B), os trofozoítos conjugam-se formando o pré-cisto (diplóide), que evolui para forma cística.

Fonte: Esteves (2010).

Inicialmente a forma trófica fixa-se as células hospedeiras, especificamente, às células epiteliais do tipo I do alvéolo pulmonar (pneumócitos do tipo I), onde se desenvolve progressivamente, preenchendo as cavidades alveolares, num processo que conduz à insuficiência respiratória do hospedeiro (Skalski *et al.*, 2015; Vera & Ruenda, 2021; Weyant *et al.*, 2021).

O trofozoíto é uma célula mononuclear pequena (1-8 μ), pleomórfica, com paredes finas e filópodos. As formas tróficas haploides dividem-se por fissão binária (fase assexuada) e podem conjugar-se para formar o pré-cisto (diplóide) (Skalski *et al.*, 2015; Weyant *et al.*, 2021).

Os pré-cistos iniciais são redondos e mononucleares e passam por diferentes estágios dividindo o seu núcleo e engrossando a parede, o que culmina na formação do cisto na fase de reprodução sexuada (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Skalski *et al.*, 2015; Weyant *et al.*, 2021).

O cisto ou esporo é uma estrutura semelhante a um asco, mede cerca de 5 µm de diâmetro, possui uma parede celular espessa, uma membrana externa e poucos filopódios na superfície. Cada cisto contém tipicamente 8 corpos intracísticos, podendo variar entre 2 e 4, que medem cerca de 1 µm de diâmetro e são constituídos por uma membrana dupla, um único núcleo e uma mitocôndria (Skalski *et al.*, 2015; Weyant *et al.*, 2021).

Num processo de excistamento, forma-se um poro na parede do cisto e são libertados todos os corpos intracísticos, os quais se desenvolvem formando trofozoítos jovens individuais, iniciando novamente o ciclo de vida do microrganismo (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Skalski *et al.*, 2015; Weyant *et al.*, 2021).

3.3. Pneumonia por *P. jirovecii*

A pneumonia por *P. jirovecii* (PCP) é uma das infecções fúngicas oportunistas mais comuns em indivíduos de imunocomprometidos. Os principais grupos de risco incluem doentes infectados pelo HIV no estado avançado da doença (com a contagem das células CD4 ≤ 200 cl/µl), receptores de transplantes de órgãos sólidos, pacientes com neoplasias, com imunodeficiências congênitas e aqueles submetidos a terapias imunossupressoras (Alanio *et al.*, 2017; Meenakshi *et al.*, 2019; Bateman *et al.*, 2020).

A apresentação clínica da PCP é inespecífica e pode variar dependendo das condições predisponentes concomitantes, do uso e do momento da profilaxia do HIV e PCP, além da duração da doença antes de procurar atendimento médico (MacDonald *et al.*, 2024). Os sinais e sintomas mais comuns da PCP incluem febre, tosse não produtiva, hipoxemia e dispnéia progressiva, frequentemente associados a opacidades em vidro fosco nas imagens pulmonares obtidas a partir de tomografia computadorizada (Liu *et al.*, 2019; Bateman *et al.*, 2020).

A PCP pode manifestar de maneira diferente em indivíduos infectados pelo HIV e doentes imunocomprometidos por outras causas. Em indivíduos infectados pelo HIV a apresentação é subaguda, com a doença progredindo de forma mais lenta e insidiosa, geralmente com sintomas presentes por pelo menos 1 a 2 semanas. Os pacientes são classicamente taquipnéicos e taquicárdicos e apresentam poucos sinais na ausculta pulmonar (Liu *et al.*, 2019; MacDonald *et al.*, 2024). Em pacientes imunocomprometidos, seronegativos para o HIV, a infecção tende a evoluir rapidamente para a insuficiência respiratória aguda, acompanhada por uma

sintomatologia mais pronunciada, embora semelhante à dos pacientes HIV positivos (Liu *et al.*, 2019).

As características radiológicas clássicas da PCP incluem o infiltrado intersticial peri-hilar bilateral. Entretanto, é comum que a radiografia torácica seja normal no início da apresentação, especialmente em pacientes imunocomprometidos seronegativos para o HIV (Salzer *et al.*, 2018; Bateman *et al.*, 2020; Weyant *et al.*, 2022). Muitas vezes, as alterações radiológicas são discretas e a radiografia pode ser inconclusiva ou não mostrar patologias pulmonares que são visíveis na tomografia computadorizada (Salzer *et al.*, 2018). A tomografia computadorizada frequentemente revela opacidades em vidro fosco, com distribuição central e predominância no lobo superior, como padrão radiológico típico da PCP (Salzer *et al.*, 2018; Bateman *et al.*, 2020; Weyant *et al.*, 2021).

P. jirovecii é um agente patogénico alveolar, mas raramente causa infecção disseminada, ocorrendo principalmente em pacientes com HIV avançado, em pacientes que não estão em profilaxia para PCP ou que estão em tratamento com pentamidina em aerossol. A apresentação clínica depende do órgão envolvido e pode apresentar-se com ou sem os achados pulmonares típicos (Esteves, 2010; Skalski *et al.*, 2015; Meenaski *et al.*, 2019).

3.4. Transmissão e Colonização do *P. jirovecii*

Os mecanismos de transmissão entre *Pneumocystis* spp. e os seus respectivos hospedeiros não são totalmente conhecidos (Alanio & Bretagne, 2017). Com base em estudos realizados em modelos animais e em seres humanos, propôs-se que a via mais provável de transmissão entre indivíduos é a via aérea, através da inalação das formas císticas do fungo (Alanio & Bretagne, 2017; Vera & Ruenda, 2021).

A hipótese de circulação aérea constante de *P. jirovecii* e a exposição precoce na infância sugerem que a PCP pode ser resultado da reativação de organismos adquiridos na infância ou da multiplicação de organismos recentemente adquiridos (Alanio & Bretagne, 2017). Contudo, existem evidências robustas de que a PCP clínica ocorre pela aquisição de uma nova infecção (Vera & Ruenda, 2021).

A colonização ou infecção assintomática é definida como o isolamento de *P. jirovecii* em amostras respiratórias de indivíduos imunocomprometidos ou imunocompetentes sem

sintomas específicos ou história de PCP, com baixa carga parasitária demonstrada por métodos convencionais ou moleculares (Alanio & Bretagne, 2017; Cillóniz *et al.*, 2019).

Os seres humanos infectados ou colonizados são os reservatórios de *P. jirovecii*, e a transmissão ocorre de pessoa para pessoa, com o sistema respiratório servindo como porta de entrada e saída. No entanto, ainda não está claro quanto tempo os portadores podem permanecer colonizados e se existe um estado transitório de colonização (Vera & Ruenda, 2021).

A colonização por *P. jirovecii* tem implicações significativas, pois facilita a transmissão de pessoa para pessoa e permite que o fungo circule na comunidade, representando uma ameaça grave quando transmitido a indivíduos com alto risco de infecção. O acúmulo de resíduos fúngicos em indivíduos com defeitos imunitários pode evoluir para PCP, aumentando os casos de mortalidade (Alanio & Bretagne, 2017; Cillóniz *et al.*, 2019; Le Gal *et al.*, 2024).

Determinadas características biológicas de *P. jirovecii* facilitam a sua persistência prolongada no hospedeiro. Este microrganismo possui a capacidade de alterar seus antígenos de superfície, especialmente o complexo de glicoproteínas de superfície principal. Essa variabilidade antigénica está associada à evasão da resposta imune do hospedeiro, o que permite que a manutenção da colonização (Hauser, 2019).

3.5. Métodos de diagnóstico da pneumonia por *P. jirovecii*

O diagnóstico da PCP baseia-se na combinação de sintomas clínicos, achados radiográficos e observação microscópica de cistos em lâminas sujeitos a coloração por metilamina prata ou por imunofluorescência (Meenakshi *et al.*, 2019; Bateman *et al.*, 2020; Weyant *et al.*, 2021).

Em doentes com suspeita clínica de PCP, deve se iniciar imediatamente o tratamento empírico. Não havendo necessidade de atrasar o início do tratamento para o diagnóstico laboratorial, tendo em conta que os cistos persistem durante vários dias no material respiratório, mesmo com tratamento específico para a PCP (Salzer *et al.*, 2018).

As amostras clínicas utilizadas no diagnóstico da PCP podem ser classificadas em amostras obtidas por técnicas invasivas, como a biópsia pulmonar ou o lavado broncoalveolar (LBA), e em amostras obtidas por técnicas não invasivas, como a expectoração induzida ou espontânea, as secreções brônquicas, o aspirado nasofaríngeo ou o lavado oral (Bateman *et al.*, 2020).

O LBA é a amostra padrão para o diagnóstico da PCP, pois é considerada a amostra respiratória de maior qualidade. A colheita do líquido do LBA é efectuada por broncoscopia, no lobo médio, permitindo a visualização de *P. jirovecii* em 51% dos casos quando efectuada após um teste de expectoração induzida negativo (Tang *et al.*, 2018; Bateman *et al.*, 2020). No entanto, a broncoscopia apresenta limitações por ser um procedimento invasivo, requer instalações e técnicos treinados, e pode não ser viável para pacientes com doença pulmonar avançada ou em estado de distress respiratório (MacDonald *et al.*, 2024).

3.5.1. Diagnóstico citológico

A coloração da parede do cisto é a técnica preferencial de diagnóstico microscópico devido á sua capacidade de análise rápida e ao mínimo conhecimento necessários para a interpretação (Bateman *et al.*, 2020). As colorações de Giemsa, Diff-Quik e Wright podem permitir a detecção do cisto, mas não coram a sua parede, enquanto as colorações de Gomori-metamina-prata, Gram-Weigert, violeta cresyl echt, azul de toluidina O e calcofluor branco coram a parede celular (Bateman *et al.*, 2020; Weyant *et al.*, 2021).

A técnica de broncoscopia com LBA tem uma sensibilidade de 90-99%. No entanto, a expectoração induzida oferece uma opção menos invasiva que a broncoscopia, mas com sensibilidade abaixo de 50%, dependendo da técnica de colheita e do indivíduo que fornece a amostra (Senécal *et al.*, 2021). A expectoração tem uma sensibilidade baixa para a PCP e a sua colheita não é recomendada para o diagnóstico (Weyant *et al.*, 2021).

O diagnóstico microscópico de *P. jirovecii*, apesar de ser o método de confirmação, tem baixa acurácia diagnóstica pois depende da qualidade e do tipo de amostras, da carga fúngica, principalmente em pacientes HIV negativo sob profilaxia, e à competência dos observadores que analisam as lâminas (Bateman *et al.*, 2020; Weyant *et al.*, 2021).

3.5.2. Imunofluorescência

As colorações por imunofluorescência através de anticorpos monoclonais apresentam maior sensibilidade e especificidade quando comparadas com as colorações convencionais. Podem corar os cistos assim como os trofozoítos e apresentam vantagens como a facilidade de execução, repetibilidade e menor dependência da competência do técnico para a sua realização

e interpretação, porém requer um microscópio de fluorescência com filtro para isotiocianato de fluoresceína (Esteves, 2010).

3.5.3. Métodos sorológicos

A medição do (1,3)-Beta-D-Glucano (BG), um constituinte da parede celular na forma de vida cisto de *P. jirovecii* e vários outros patógenos fúngicos, é geralmente mais elevada em doentes infectados do que não infectados. No entanto, é um marcador inespecífico para PCP definitiva, porque pode ser positivo noutras infecções fúngicas, em doentes em terapia com albumina ou globulina e alguns medicamentos antimicrobianos e em pacientes submetidos a hemodiálise com membranas e filtros à base de celulose. O BG, como teste, é melhor utilizado para excluir a PCP devido ao seu forte valor preditivo (Bateman *et al.*, 2020; Weyant *et al.*, 2021; MacDonald *et al.*, 2024).

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima intracelular associada ao metabolismo de todos os seres vivos, que é libertada quando há destruição da membrana citoplasmática das células do hospedeiro. Os níveis séricos de LDH são elevados nos doentes com infecção por *P. jirovecii*, podendo o seu doseamento no soro ser útil para verificar o estado da doença e para avaliar a resposta à terapêutica (Esteves *et al.*, 2010; Bateman *et al.*, 2020; MacDonald *et al.*, 2024). A quantificação de LDH sérica não pode ser utilizado como um teste de diagnóstico único porque tem pouco valor preditivo para PCP, pois níveis de LDH elevado são provavelmente um reflexo da inflamação e lesão subjacentes e não são específicos da PCP (Bateman *et al.*, 2020).

Os biomarcadores Krebs von den Lungen-6 e S-adenosilmetionina, antígenos libertados pelo interstício pulmonar durante um processo inflamatório, são avaliados como potenciais indicadores para a PCP quando combinados com o BG. No entanto, devido à sua baixa especificidade e sensibilidade, o seu uso não é recomendado actualmente (Bateman *et al.*, 2020).

3.5.4. Métodos moleculares

A *nested* PCR (*n*-PCR) e a PCR em tempo real (qPCR) são as principais técnicas de diagnóstico molecular utilizadas, cada um com diferentes níveis de sensibilidade e especificidade, dependendo do protocolo e alvo selecionado (Almeida-Silva *et al.*, 2023).

As regiões genômicas frequentemente amplificadas por essas técnicas incluem o espaçador internamente transcrito, a subunidade grande do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*), a subunidade menor do rRNA mitocondrial, a região conservada dos genes da família das glicoproteínas *major* de superfície, o dihidrofolato redutase e a proteína de choque térmico (Song *et al.*, 2016).

A sequência parcial do gene *mtLSU rRNA* é o alvo molecular mais adequado e sensível para PCR devido ao seu envolvimento em processos metabólicos essenciais, elevado grau de conservação genética e abundância de mitocôndrias em *P. jirovecii* (Almeida-Silva *et al.*, 2023).

A *n*-PCR é uma variante da PCR convencional que utiliza um procedimento robusto e sensível para amplificar selectivamente regiões específicas do DNA alvo, empregando duas etapas consecutivas de amplificação com conjunto distinto de iniciadores direcionados para um gene multicópia no genoma de *P. jirovecii* (Wakerfield *et al.*, 1990; Esteves, 2010). Embora essa técnica não distinga entre a colonização e infecção sintomática, é aplicável para a maioria das amostras clínicas e fornece resultados precisos, principalmente para indivíduos não infectados pelo HIV.

O diagnóstico da doença é feito com base na *n*-PCR ou com PCR convencional, quando o doente apresenta sinais clínicos e radiológicos compatíveis, especialmente em pacientes adultos (Salzer *et al.*, 2018; Weyant *et al.*, 2022; Almeida-Silva *et al.*, 2023).

Por outro lado, a qPCR é considerada o método mais confiável e econômico, em termos de tempo de resposta, para detectar e quantificar *P. jirovecii* em amostras respiratórias. Permite distinguir a colonização da infecção sintomática e a monitorização da resposta terapêutica (Song *et al.*, 2016). No entanto, não há um consenso sobre a linha de corte para definir infecção, pois varia de acordo com o kit comercial utilizado e a plataforma utilizada para a PCR (Weyant *et al.*, 2022).

3.6. Tratamento e Profilaxia da pneumonia por *P. jirovecii*

3.6.1. Tratamento da pneumonia por *P. jirovecii*

O tratamento da infecção pelo *P. jirovecii* é baseado na gravidade da doença e no diagnóstico específico. O principal fármaco utilizado no tratamento da PCP é o cotrimoxazol (CTZ), uma combinação de trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), que actua inibindo a via biossintética do ácido fólico. O CTZ é altamente eficaz comparado a outros medicamentos, devido à sua boa penetração, resposta clínica rápida e baixo custo, sendo de primeira linha em indivíduos com e sem HIV (Esteves *et al.*, 2010; Meenakshi *et al.*, 2019).

O tratamento é geralmente administrado durante 21 dias, por via oral ou parenteral, numa dosagem de 15-20 mg de TMP e 75-100 mg de SMX mg/kg/dia administrados de 6 ou 8 horas (Salzer *et al.*, 2018; Meenakshi *et al.*, 2019).

O tratamento alternativo e preferencial para os pacientes com PCP e que desenvolvem reacções adversas ao CTZ, ou que não respondem à terapêutica com este fármaco é a pentamidina. A pentamidina intravenosa é administrada durante pelo menos 14-21 dias numa dose de 4 mg/kg/dia (Salzer *et al.*, 2018).

Em casos de hipersensibilidade ou ausência de resposta ao CTZ ou à pentamidina, outros regimes terapêuticos podem ser utilizados, como a atavaquona, associação de dapsona com TMP, a combinação de primaquina-clindamicina, capsosfungina combinada ou não com CTZ (Salzer *et al.*, 2018; Weyant *et al.*, 2021).

A terapia com corticosteroides adjuvantes é um tratamento alternativo recomendado para pacientes infectados pelo HIV com PCP moderada a grave. Esta deve ser iniciada o mais cedo possível, preferencialmente dentro de 72 horas após o início da terapia específica para a PCP (Salzer *et al.*, 2018). A administração de corticosteroides visa reduzir a resposta inflamatória decorrente da morte celular de *P. jirovecii*, melhorando a função pulmonar e aumentando as chances de sobrevivência (Meenakshi *et al.*, 2019).

3.6.2. Profilaxia da pneumonia por *P. jirovecii*

A administração da profilaxia diminuiu significativamente a prevalência de PCP em pacientes infectados em risco, particularmente em doentes com HIV na fase inicial do tratamento antirretroviral (TARV). Actualmente a maioria dos casos ocorre em doentes com HIV avançando ou que não aderem ao tratamento (Weyant *et al.*, 2021).

O CTZ é também utilizado como medicamento de eleição para a profilaxia, numa dose padrão de um comprimido diário de força dupla, isto é, 160 mg de TMP e 800 mg de SMX (Weyant *et al.*, 2021).

A profilaxia primária é indicada para doentes com HIV com contagem de células CD4 inferior a 200 células/ μ L, candidíase orofaríngea e doentes com antecedentes de outras infeções oportunistas. A profilaxia secundária é recomendada para doentes com antecedentes de PCP (Meenakshi *et al.*, 2019; Weyant *et al.*, 2021).

Os médicos podem suspender a profilaxia do tratamento primário e secundário em doentes que responderam eficazmente a TARV e com aumento da contagem das células CD4 superior a 200 células/ μ L (Meenakshi *et al.*, 2019).

3.7. Sarcoma de Kaposi

O Sarcoma de Kaposi (SK) é um tumor linfo-angioproliferativo multifocal, mesenquimal e de baixo grau, causado pela combinação da infecção pelo vírus associado ao Sarcoma de Kaposi ou herpesvírus humano-8 (KSHV/HHV8) e imunidade comprometida do hospedeiro. O KSHV é um herpesvírus γ 2 que pertence à família do vírus de DNA de fita dupla Herpesviridae (Micali *et al.*, 2022).

O SK apresenta quatro variantes epidemiológicas: (i) o SK clássico, que afecta principalmente as extremidades de pacientes idosos de ascendência mediterrânea e judaica, segue geralmente um curso crónico indolente; (ii) o SK Africano ou endémico que afecta crianças e jovens africanos; (iii) o SK iatrogénico e (iv) o SK associado à SIDA ou epidémico (Micali *et al.*, 2022).

A prevalência do KSHV apresenta variações geográficas significativas. Nas populações adultas em geral, a infecção é bastante comum na África subsaariana com uma seroprevalência

superior a 50%, relativamente comum na região mediterrânea (20-30%) e incomum na Europa Ocidental e do Norte, na Ásia e nas Américas (5-10%) (Cesarman *et al.*, 2019).

As manifestações clínicas das formas epidemiológicas do SK se sobrepõem, embora certas características estejam mais comumente associadas a uma forma de SK do que a outras. Em todas as formas de SK, as lesões cutâneas geralmente se apresentam como lesões múltiplas, pigmentadas, elevadas ou planas, indolores, que não empalidecem. As lesões cutâneas podem ocorrer em associação com lesões viscerais nos pulmões e no trato gastrointestinal (Cesarman *et al.*, 2019).

O SK pulmonar geralmente apresenta-se com dispnéia, tosse seca, perda de peso e, por vezes, hemoptise, com ou sem febre, dor pleurítica e sibilância. Em alguns casos, pode apresentar-se totalmente assintomático (Yoo *et al.*, 2005; Cesarman *et al.*, 2019). Na radiografia e tomografia computadorizada do tórax as lesões pulmonares geralmente aparecem como infiltrado reticulonodular difuso e/ou derrame pleural, opacidades densas, nodulares, lesões em forma de chama ou sinal de chamas (Cesarman *et al.*, 2019; Micali *et al.*, 2022).

O SK é geralmente diagnosticado com base na observação clínica macroscópica das lesões cutâneas e confirmado através da biópsia das lesões pela coloração convencional com hematoxilina e eosina (Cesarman *et al.*, 2019).

O tratamento do SK é difícil devido à sua heterogeneidade em termos de localização, extensão e taxa de crescimento. A terapia local ou sistêmica é adaptada às condições do doente e às características do SK (Ruocco *et al.*, 2013). Em pacientes com formas de SK nas quais a imunossupressão é potencialmente reversível, a abordagem de primeira linha é reforçar o sistema imunológico (Cesarman *et al.*, 2019).

3.8. Epidemiologia da pneumonia por *P. jirovecii* e Sarcoma de Kaposi

P. jirovecii foi reconhecido pela primeira vez como um agente patogénico clinicamente relevante durante a Segunda Guerra Mundial, quando causou pneumonia em crianças malnutridas, em orfanatos na Europa e casos de pneumonia com risco de vida em crianças com leucemia linfoblástica aguda (Bateman *et al.*, 2020).

O SK e a PCP foram identificados como os primeiros indicadores da epidemia do SIDA. Em 1981, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) descreveu 26 homens

homossexuais com lesões típicas do SK, dos quais 31% morreram em dois anos devido ao curso agressivo da doença. Biópsias confirmaram que 16% desses pacientes estavam infectados por *P. jirovecii*. A presença de múltiplas infecções oportunistas nestes pacientes levou à definição do padrão clínico que ficou conhecido como SIDA (Friedman-Kein *et al.*, 1981).

Após a descoberta do SIDA nos Estados Unidos da América, diversos estudos revelaram uma prevalência de comorbilidade da PCP e SK variando entre 7% e 50% (Burkes *et al.*, 1985; Lemlich *et al.*, 1987; Mitchel *et al.*, 1992). Durante o mesmo período, na África Subsaariana, esta comorbilidade foi observada em 14% a 33% dos pacientes (Downing *et al.*, 1984; Pozniak *et al.*, 1992; Malin *et al.*, 1995). Entretanto, com a introdução da TARV e a redução concomitante dessas doenças, houve declínio significativo nos estudos sobre essa comorbilidade.

Os primeiros estudos realizados em países africanos em pacientes adultos infectados pelo HIV referem que a PCP é uma doença com baixa frequência, especialmente em países tropicais. A maioria dos estudos iniciais relatou taxas de prevalência de 0% a 11% em doentes infectados com HIV (Kamafu *et al.*, 1993; Batungwanayo *et al.*, 1994; Ansari *et al.*, 2002; Aderaye *et al.*, 2003).

A dificuldade de notificação de PCP em África pode ser fundamentada por vários factores, incluindo a especulação segundo a qual a morte precoce não permitia que doentes Africanos infectados por HIV atingissem o grau de imunossupressão que os tornasse susceptíveis de desenvolverem a PCP, exposição precoce ao *P. jirovecii* que resulta numa melhoria da imunidade, modulação imunitária por outras infecções, utilização de técnicas de diagnósticos menos sensíveis, falta de pessoal de laboratório devidamente qualificado, e a ocorrência de estirpes menos virulentas e variação sazonal (Morris *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2011).

Actualmente, a prevalência da PCP clínica na África Subsaariana é de 19% em indivíduos adultos HIV+ e 9% em indivíduos colonizados (Willis *et al.*, 2021). Além disso, a prevalência da PCP em adultos na região africana varia consideravelmente, com taxas de 43% na África do Sul, 39% em Uganda e 33% no Zimbabwe (Moris *et al.*, 2004).

Em Moçambique, estima-se que a prevalência da PCP em adultos seja de 16,3%, enquanto em crianças com imunodeficiência avançada, a taxa é de 9,2% (Sarcarlal e Dewing, 2016).

Na África subsaariana, a prevalência da comorbilidade do SK e *P. jirovecii* é variável entre os países. Estudos realizados em Uganda revelaram uma prevalência de *P. jirovecii* em 3% e 14% dos pacientes adultos suspeitos de SK (Yoo *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2012). Em Malawi, 15% dos pacientes com Sarcoma de Kaposi pulmonar tinham infecção por *P. jirovecii* (Hartung *et al.*, 2011). Contrariando os outros países, na Tanzânia foi reportada 0% e na África do Sul, 2% de comorbilidade em pacientes com SK (Kibiki *et al.*, 2007; Chiliza *et al.*, 2018).

Em Moçambique, dados preliminares indicaram que 20% dos doentes adultos infectados pelo HIV admitidos no HCM com SK tinham PCP (Vilanculo, 2017).

Não obstante a diminuição de casos após a introdução da TARV, a infecção por PCP continua contribuindo significativamente para morbimortalidade relacionadas ao HIV em crianças e adultos da África Subsariana com uma taxa de letalidade de 18% (Wasserman *et al.*, 2016).

A elevada frequência de mortalidade em doentes com HIV é relacionada a idade avançada, níveis de hemoglobina e PaO₂ baixos na admissão hospitalar, episódios subsequentes de PCP, sarcoma de Kaposi pulmonar e comorbilidades pré-existentes (Alvaro-Meca *et al.*, 2015).

4. Área de estudo

A área de estudo foi o Hospital Central de Maputo (HCM) e as amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina – Universidade Eduardo Mondlane (LM-FM).

O HCM situa-se na Av. Agostinho Neto nº164, Cidade de Maputo. É um hospital de nível quaternário, considerado de referência no país, recebendo utentes não só da cidade e província de Maputo, bem como oriundos de outras províncias do Sul de Moçambique (HCM, 2024).

Actualmente o HCM possui uma capacidade para 1500 camas, e alberga vários serviços clínicos como Serviço de Urgência, Medicina, Ortopedia, Medicina Física e Reabilitação, Ginecologia e Obstetrícia, Oncologia e Pediatria (HCM, 2024).

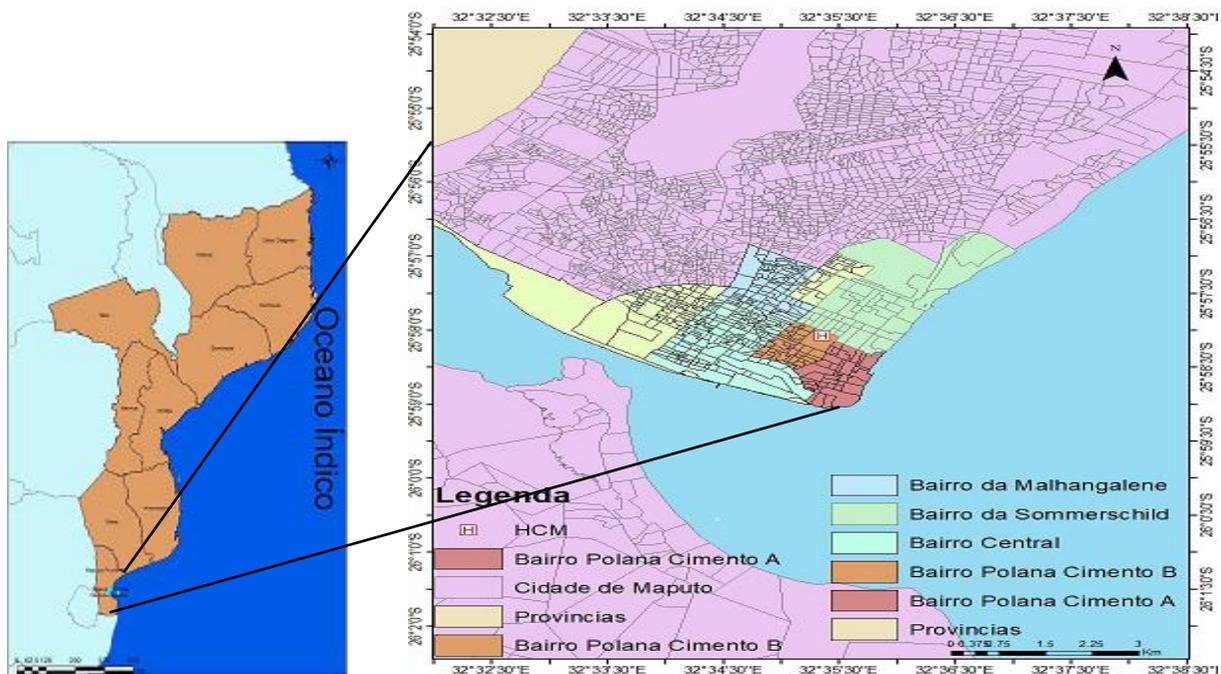


Figura 2: Mapa da localização geográfica do Hospital Central de Maputo.

Fonte: ArcGIS (2023).

5. Metodologia

5.1. Tipo de estudo

O presente estudo foi do tipo transversal descritivo com a colheita de dados quantitativos de forma retrospectiva.

5.2. População e Amostragem

No presente estudo foram incluídas amostras de Lavado Broncoalveolar (LBA) de pacientes adultos com SK e HIV+, conservadas no biobanco do LM-FM. As amostras foram obtidas no âmbito do estudo principal intitulado: “Preditores de Sarcoma de Kaposi Pulmonar no Hospital Central de Maputo”. A amostragem foi do tipo convencional, não probabilística, através da inclusão de todas as amostras de LBA de pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi e HIV+.

5.2.1. Critérios de inclusão

Foram analisadas amostras de LBA obtidas de pacientes adultos diagnosticados com SK e HIV+ com idade ≥ 15 anos, que apresentavam sinais ou sintomas de infecção pulmonar, atendidos no HCM no período entre 2016 e 2019.

O estudo incluiu todas amostras de LBA guardadas no biobanco do LM-FM, inclusive aquelas que não tinham informações clínico-demográficas.

5.2.2. Critérios de exclusão

Não foram aplicados critérios de exclusão neste estudo, portanto, nenhuma amostra foi excluída.

5.3. Tipo e Variáveis do estudo

- ◆ **Variáveis demográficas:** Sexo e idade.
- ◆ **Variáveis clínicas: diagnóstico clínico compatível com PCP** – definido pela presença simultânea de pelo menos três dos seguintes sintomas: tosse, febre, dispneia e hipoxemia e radiograma do tórax sugestivo de PCP; **infecção assintomática ou colonização** – identificação de DNA do *P. jirovecii* sem diagnóstico clínico compatível da PCP; e **risco de contrair a infecção por *P. jirovecii*** – correspondeu a contagem das células CD4, onde foi definido o grupo de

baixo risco (mais de 200 células/ μL); grupo de risco moderado (entre 50 e 200 células/ μL) e grupo de risco elevado (menos de 50 células/ μL).

5.4. Materiais e Equipamentos

Tabela 1: Materiais e equipamentos utilizados no estudo

Material de escritório	
Bloco de notas	Canetas
Lápis HB	Tinteiro de impressora
Marcadores	Papel A4
Consumíveis de Laboratório	
Luvas de procedimento	Batas descartáveis
Tubos de <i>ependorf</i> de 1,5 ml	Pontas com filtros estéreis descartáveis de 10 a 1000 μl
Papel toalha	Tubos de PCR
Micropipetas monoclonais de 10; 100; 200 e 1000 μL	Barca de pesagem
Espátula	Proveta graduada de 100 ml
Óculos contra luz UV	Rack de 60 furos para microtubos
Erlenmeyer de 100ml	Parafilme
Reagentes	
Água desionizada DNA/RNA free (dd H ₂ O)	Albumina Sérica Bovina (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Tampão TAE 1X	Agarose
Corante Gel red [10.000X]	Álcool a 70%
PCR SuperMix [2X]	DNA ladder (100pb)
Iniciadores pAZ 102-E; 102-H; 102-X e 102-Y [10 μM] do gene <i>mtLSU rRNA</i>	DNA gel Loading Dye [6X]

Kit <i>QIAamp</i>	Etanol “grade” 96% - 100%
Equipamentos	
Micro-ondas	Geleira 2°C – 8°C
Geleira -80°C	Fonte e Cuba electroforética
Termociclador GeneAmp® PCR System 9700	Balança analítica
Câmara de PCR (PLAS LABS)	Transiluminador de UV (Euro Lone)
Agitador tipo vórtex	Microcentrífuga
Máquina fotográfica digital	Placa de aquecimento

5.5. Extração de DNA

A extracção de DNA da amostra de Lavado broncoalveolar consistiu nos passos seguintes:

- 1) Deixar a amostra estabilizar à temperatura ambiente;
- 2) Ligar a placa de aquecimento à temperatura de 56°C;
- 3) Identificar os tubos de *ependorf*;
- 4) Centrifugar a amostra a 1000 rpm por 5 min;
- 5) Pipetar 20 µl de Proteinase K (fornecido no kit) para o fundo do tubo de *Eppendorf*;
- 6) Adicionar ao tubo 200 µl da amostra no tubo de *Eppendorf* contendo Proteinase K;
- 7) Adicionar 200 µl do *Elution buffer* no tubo controle negativo;
- 8) Adicionar 200 µl do *Lysis buffer* para o tubo que contém a amostra e homogeneizar no vórtex por 15s;
- 9) Incubar o tubo que contém a amostra na placa de aquecimento à 56°C por 10 min;
- 10) Trocar as luvas para evitar contaminação;
- 11) Centrifugar o tubo à 8000 rpm por 1 min, para remover possíveis gotículas do interior da tampa e parede do tubo;
- 12) Adicionar 200 µl do etanol (96-100%) no tubo e homogeneizar no vórtex por 15s;
- 13) Incubar à temperatura ambiente durante 5 min para uma completa precipitação;
- 14) Centrifugar o tubo à 8000 rpm por 1 min;

- 15) Transferir toda solução para a colunas *Mini spin QIAamp* (fornecido no Kit) com auxílio da micropipeta, sem tocar o anel da coluna;
- 16) Centrifugar o tubo a 8000 rpm por 1 min;
- 17) Descartar o tubo coletor que contém o filtrado e transferir a coluna para um novo tubo coletor;
- 18) Adicionar 500 µl do tampão de lavagem AW1 sem molhar o anel da coluna;
- 19) Centrifugar o tubo a 8000 rpm por 1 min;
- 20) Descartar o tubo coletor que contém o filtrado e transferir a coluna para um novo tubo coletor;
- 21) Adicionar 500 µl do tampão AW2 sem molhar o anel da coluna;
- 22) Centrifugar o tubo a 14000 rpm, por 3 min;
- 23) Descartar o tubo coletor que contém o filtrado e transferir a coluna para um novo tubo coletor ou tubo *Eppendorf* (não fornecido no Kit),
- 24) Centrifugar à velocidade máxima durante 1 min;
- 25) Transferir a coluna para um novo tubo de *Eppendorf* devidamente identificado e adicionar 160 µl do *Elution buffer*, para obtenção de ADN;
- 26) Incubar à temperatura ambiente durante 5 min;
- 27) Centrifugar por 8000 rpm, por 1 min;
- 28) Descartar a coluna;
- 29) Manter a amostra do DNA extraído no tubo *Eppendorf* guardar -20°C até o momento do uso.

5.6. Detecção molecular do *P. jirovecii*

5.6.1. PCR do gene *mtLSU rRNA*

A detecção molecular de *P. jirovecii* foi feita através da técnica de *nested*-PCR para identificação do gene *mtLSU rRNA*, marcador molecular da espécie, com 346pb. As sequências de iniciadores específicos do gene *mtLSU rRNA* estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos iniciadores utilizados na amplificação do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii* por *nested* PCR.

PCR	Iniciador	Sequencia (5' → 3')	Dimensão (pb)	Amplificação (pb)
1ª Parte	pAZ 102-E	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	20	346
	pAZ 102-H	GTGTACGTTGCAAAGTACTC	20	
2ª Parte	pAZ 102-X	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	22	
	pAZ 102-Y	TCACTTAATATTAATTGGGGAGC	23	

Fonte: Wakefield *et al.*, (1990) e Esteves (2010).

5.6.1.1. Condições de *nested* PCR do gene *mtLSU rRNA*

O *master mix* foi preparado com base nas concentrações e volumes indicados na Tabela 3.

Tabela 3: Mastermix do gene *mtLSU rRNA*

Reagentes		[] Final (50 µl)	1X
1ª Etapa	2ª Etapa		
dd H ₂ O	dd H ₂ O	-	32,5 µL
Supermix [2X]	Supermix [2X]	[1X]	12,5 µL
BSA (0.5 µg/ µl)	BSA (0.5 µg/ µl)	0,01 µg/ µl	1 µL
PAZ 102-E	PAZ 102-X	0,2 µM	1 µL
PAZ 102-H	PAZ 102-Y	0,2µM	1 µL
DNA molde	DNA molde	-----	2 µL
Volume total			50 µL

Em uma câmara de PCR, preparou-se a mistura principal adicionando os reagentes em ordem decrescente dos volumes, isto é, do reagente de maior volume (ddH₂O) até ao de menor volume (BSA) em um tubo de *Eppendorf*. De seguida, aliquotou-se 48 µL da mistura principal para cada tubo de PCR. Em cada tubo de PCR foram adicionados 2 µL de DNA molde para os tubos

das amostras, 2 μ L de dd H₂O para o controlo negativo e 2 μ L de DNA positivo para o gene *mtLSU rRNA* para o controlo positivo. A preparação do master mix foi igual para a 1^a e 2^a parte da *nested* PCR.

Os tubos de PCR foram colocados num termociclador (GeneAmp® PCR System 9700) programado para as condições térmicas indicadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições térmicas aplicadas na *nested* PCR para amplificação específica do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*

Condições de amplificação*	
Desnaturação inicial	95°C, 3 minutos
Desnaturação	95°C, 90 segundos
Anelamento	55°C, 90 segundos X 40 ciclos
Extensão	72°C, 2 minutos
Extensão final	72°C, 10 minutos

*As condições térmicas de amplificação são iguais na 1^a e na 2^a parte da *nested* PCR

Fonte: Wakefield *et al.*, 1990 e Esteves, 2010.

5.6.2. Electroforese em gel de agarose

5.6.2.1. Preparação do gel de agarose

A preparação do gel de agarose a 1,5% consistiu nos seguintes passos:

- 1) Montou-se a cuba para electroforese e colocou-se os pentes;
- 2) Pesou-se 1,5 g de agarose em uma balança analítica e colocou-se em um frasco;
- 3) Mediu-se, com auxílio de uma proveta, 100 mL da solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X e adicionou-se ao frasco contendo a agarose;
- 4) Homogeneizou-se a mistura e levou-se ao micro-ondas para dissolução da agarose por cerca de 3 minutos;
- 5) Resfriou-se o gel por aproximadamente 1 minuto e adicionou-se 0,5 μ L do corante Gel Red [10.000X];

- 6) Vazou-se todo volume do gel na cuba electroforética com os pentes e deixou-se polimerizar por 30 minutos à temperatura ambiente.

5.6.3. Visualização do produto da PCR

O DNA amplificado por PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose a 1,5%, para avaliação dos produtos de amplificação (amplicons) obedecendo os seguintes passos:

- 1) Em uma tira de parafilme pipetou-se 2µl de tampão de aplicação (Loading Dye 6X) e misturou-se a 10 µl de amplicons. A mistura de 12 µl foi carregada nos respectivos poços.
- 2) Carregou-se 5 µl de marcador *DNA Ladder* 6X (100pb) em dois poços nas extremidades do gel.
- 3) Ligou-se a fonte elétrica da cuba a 100V durante 70 minutos.
- 4) Retirou-se cuidadosamente o gel da cuba e colocou-se no transiluminador (Euro Lone) para visualização das bandas de DNA por acção de luz ultravioleta;
- 5) Registou-se as imagens do gel com uma máquina fotográfica digital.

5.7. Considerações éticas

Este estudo faz parte do projecto principal intitulado: “Preditores de Sarcoma de Kaposi Pulmonar no Hospital Central de Maputo” aprovado pelo Comité Institucional de Bioética em Saúde da Faculdade de Medicina e do HCM e pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde com a Ref:374/CNBS/19 (Anexo 1).

De modo a garantir a confidencialidade das informações, somente a investigadora principal do estudo e os supervisores tiveram acesso aos dados colhidos no livro de registo do LM-FM e foi usado um sistema de anonimização em que os nomes dos participantes foram substituídos por códigos. O estudo não apresentou nenhum risco potencial para os participantes, uma vez que não houve intervenção directa com os pacientes e os dados foram obtidos de forma secundária.

5.8. Análise de dados

Os dados clínicos e demográficos foram colhidos em fichas dos pacientes, arquivadas no LM-FM, previamente criadas no estudo principal. A informação foi digitalizada e organizada no programa Microsoft Office Excel 2013. A análise estatística descritiva das variáveis foi realizada no mesmo programa através da elaboração de tabelas e gráficos de frequência.

6. Resultados

6.1. Características clínico-demográficas dos participantes do estudo

O presente estudo incluiu um total de 145 amostras de LBA de pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi (SK) e infecção pelo HIV, obtidas do biobanco do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina (LM-FM), das quais 107 (73,8%) apresentavam dados clínico-demográficos completos contra 38 (26,2%) com informações incompletas.

A maioria dos pacientes, 96 (66,2%) foram do sexo masculino e 48 (33,1%) do sexo feminino. A idade variou entre 16 e 91 anos com uma média de 37 anos e desvio padrão de 10,25 anos. A moda das idades foi observada na faixa etária dos 30 aos 44 anos.

As características clínicas mais frequentes para o total de 145 pacientes incluídos no estudo foram: tosse em 89 (61,4%), oximetria de pulso maior de 95% em 84 (58%) e profilaxia contra *P. jirovecii* em 51 (35,2%) dos pacientes. Adicionalmente, a febre foi observada em 12 (8,3%), dispneia em 37 (25,5%) e o infiltrado intersticial na radiografia do tórax em 47 (32,4%) dos pacientes, sendo essas as menos apresentadas (Tabela 5).

Tabela 5: Características clínico-demográficas dos pacientes com Sarcoma de Kaposi e HIV+ incluídos no estudo.

Características clínico-demográficas	Número de pacientes, N (%)
Sexo	
Feminino	48 (33,1)
Masculino	96 (66,2)
Sem informação	1 (0,7)
Faixa etária	
15-29 Anos	27 (18,6)
30-44 Anos	90 (62,1)
45-64 Anos	23 (15,9)
65-91 Anos	3 (2,1)
Sem informação	2 (1,4)
Febre	
Sim	12 (8,3)
Não	95 (65,5)
Sem informação	38 (26,2)

Tosse	
Sim	89 (61,4)
Não	18 (12,4)
Sem informação	38 (26,2)
Dispneia	
Sim	37 (25,5)
Não	70 (48,3)
Sem informação	38 (26,2)
Oximetria de pulso	
90-94%	2 (1,4)
95-97%	43 (29,7)
98-100%	41 (28,3)
Não feito	21 (14,5)
Sem informação	38 (26,2)
Profilaxia contra <i>P. jirovecii</i>	
Sim	51 (35,2)
Não	56 (38,6)
Sem informação	38 (26,2)
Infiltrado intersticial	
Sim	47 (32,4)
Não	45 (31)
Não feito	14 (9,7)
Sem informação	39 (26,9)

6.2. Frequência de *P. jirovecii* em pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi e HIV+

Entre as 145 amostras de DNA analisadas, 16 (11%) foram positivas para *P. jirovecii* através de *nested*-PCR para identificação do gene *mtLSU rRNA* (Figura 3).

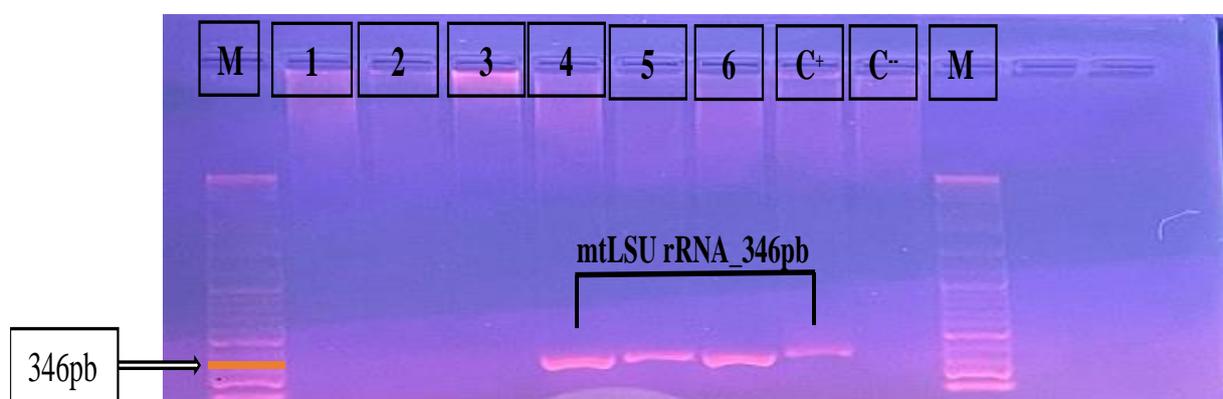


Figura 3: Electroforese em gel de agarose (1,5%) em TAE para detecção do fragmento do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial (*mtLSU rRNA*).

Legenda: M, marcador molecular (100pb); C⁺, controlo positivo; C⁻, controlo negativo. As amostras 4 (186SK), 5 (191SK), 6 (168SK) foram positivas para *P. jirovecii* e as amostras 1 (21SK), 2 (8SK) e 3 (11SK) foram negativas.

6.2.1. Relação entre as características clínico-demográficas e a colonização por *P. jirovecii*

Os resultados do presente estudo, apesar do número reduzido de amostras positivas por *n*-PCR para a realização da inferência estatística, mostram maior infecção por *P. jirovecii* em indivíduos do sexo masculino (56,3%, 9/16) em relação ao sexo feminino (43,8%, 7/16), principalmente na faixa etária dos 30 aos 44 anos (81,3%, 13/16), que constituiu a principal população do estudo (Figura 4).

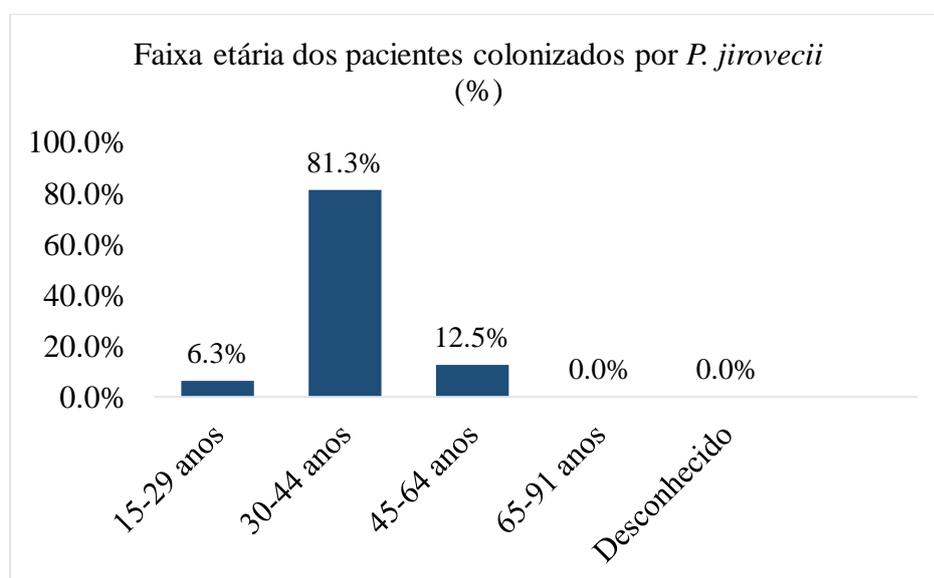


Figura 4: Frequência dos pacientes colonizados por *P. jirovecii* por faixa etária.

Do total dos 16 casos positivos de *P. jirovecii*, 11 casos positivos tinham dados completos contra 5 que não tinham informação clínica.

Os 11 casos de pacientes com dados clínicos completos e positivos para *P. jirovecii*, nenhum dos pacientes foi compatível com a Pneumonia por *P. jirovecii*, sendo assim, 100% foram considerados casos de colonização por *P. jirovecii*.

Os pacientes apresentaram diferentes sintomas, nomeadamente: tosse (56,3%, 9), radiografia do tórax com infiltrado intersticial (37,5%, 6) e dispneia (18,8%, 3). Adicionalmente, a maioria

dos pacientes não apresentava febre (68,8%, 11), hipoxemia (43,8%, 7) e cerca de metade estava sob profilaxia contra *P. jirovecii* (50%, 8).

Com base na contagem das células CD4 dos pacientes colonizados por *P. jirovecii*, 5 (31,3%) dos pacientes eram de baixo risco e 2 (12,5%) de alto risco (Figura 5).

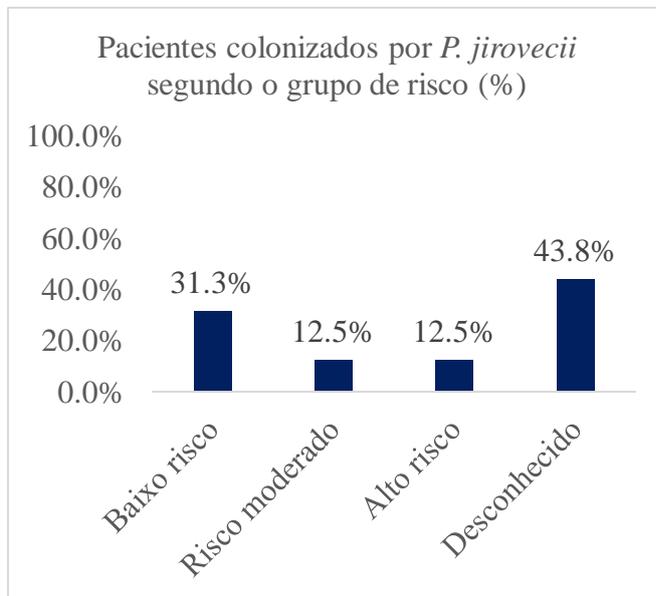


Figura 5: Frequência dos pacientes em risco de colonização por *P. jirovecii*.

7. Discussão

7.1. Frequência de *P. jirovecii* em pacientes adultos com Sarcoma de Kaposi e HIV+

O estudo teve como objectivo analisar a ocorrência de *P. jirovecii* em pacientes com Sarcoma de Kaposi (SK) atendidos no Hospital Central de Maputo (HCM), tendo sido constatado que 11% dos pacientes com SK estavam colonizados por *P. jirovecii*. Um estudo anterior realizado no HCM notificou uma prevalência elevada de 20% (Vilanculos, 2017). Ambos estudos utilizaram a mesma metodologia, portanto a diferença pode estar relacionada com às características da população incluída, visto que o estudo anterior incluiu apenas pacientes com imunossupressão avançada ($CD4 \leq 200$ células/ μ L).

Algumas pesquisas realizadas em diferentes regiões de África reportaram prevalências inferiores, onde a colonização variou entre 0,3% a 6% (Jessen *et al.*, 2010; Taylor *et al.* 2012; Hviid *et al.*, 2017). Esses estudos utilizaram a técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), no entanto, a maioria das amostras analisadas era de lavagem oral, uma técnica não invasiva, mas menos sensível para a detecção de colonização em comparação com o Lavado broncoalveolar, utilizado neste estudo (Tang *et al.*, 2018; Bateman *et al.*, 2020).

Em contrapartida, em um hospital regional de Camarões foi reportada uma alta prevalência de 42,9% de colonização por *P. jirovecii* em pacientes HIV+ (Riebold *et al.*, 2014). Essas variações podem ser atribuídas a diferenças nas características das populações, nas amostras estudadas, além de factores ambientais e climáticos (Morris *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2011; Morris & Noris, 2012).

A colonização por *P. jirovecii* em pacientes com SK pode ter implicações clínicas graves no diagnóstico e tratamento, exacerbando sintomas respiratórios e aumentando o risco de mortalidade (Micali *et al.*, 2022). Na África Subsariana onde regista-se prevalência alta de indivíduos HIV+ (5,9%), o acesso a técnica de diagnóstico precoce é limitado, desta forma a comorbilidade pode ser subdiagnosticada, agravando o quadro clínico do paciente (Taylor *et al.*, 2012; Lanaspá *et al.*, 2015; Willis *et al.*, 2021; UNAIDS, 2023).

7.2. Relação entre as características clínico-demográficas e a colonização por *P. jirovecii*

Neste estudo, *P. jirovecii* foi detectado predominantemente em indivíduos do sexo masculino 9 (56,3%). Um estudo realizado nos Estados Unidos da América, com uma população de pacientes com características semelhantes, relatou uma elevada taxa de comorbilidade de 100%

por *P. jirovecii* e SK em pacientes do sexo masculino (Kasturia *et al.*, 2017). Por outro lado, pesquisas realizadas no Hospital Geral do Limbe em Camarões e Hospital Central de Maputo em Moçambique, reportaram prevalências mais baixas, de 37% e 42%, respectivamente (Riebold *et al.*, 2014; Vilanculo, 2017). Nessas pesquisas, não houve diferenças significativas entre os sexos, e a baixa prevalência de comorbilidade entre os indivíduos do sexo masculino foi atribuída à sua fraca participação no estudo. Estes resultados sugerem que, a infecção por *P. jirovecii* é mais comum em indivíduos do sexo masculino, provavelmente devido à sua maior vulnerabilidade biológica e comportamental (Chan & Slender, 2010).

Estudos indicam que a hormona testosterona pode suprimir a resposta imunológica, enquanto altos níveis de estrogénio tendem a fortalecer, tornando as mulheres menos susceptíveis a infecções oportunistas (Chan & Slender, 2010). Além disso, homens frequentemente se envolvem em comportamentos de risco, como tabagismo e consumo de álcool, e são menos propensos a buscar cuidados de saúde preventivos, o que pode atrasar o diagnóstico e tratamento das infecções (Gay *et al.*, 2021).

No presente estudo foi observada maior frequência de colonização na faixa etária entre 30 e 44 anos de idade (81,3%). Este resultado é semelhante ao observado no estudo de Riebold *et al.*, (2014), onde a maioria dos indivíduos colonizados (52,2%) também pertencia a essa faixa etária. Por outro lado, um estudo anterior realizado do Hospital Central de Maputo reportou uma frequência baixa (22%) nesta faixa etária e maior prevalência (55%) em indivíduos com menos de 30 anos de idade (Vilanculo, 2017).

Estas discrepâncias podem ser atribuídas a época da colheita das amostras nos estudos e mudanças na tendência da prevalência do HIV/SIDA segundo a faixa etária em Moçambique. No estudo realizado por Vilanculo (2017), as amostras foram colhidas em 2015, onde a prevalência do HIV era predominante na população jovem, com 6,9% na faixa etária dos 15-24 anos (IMASIDA, 2015). A prevalência do HIV entre os jovens diminuiu ao longo do tempo para 3,1%, enquanto a faixa etária dos 30-44 anos apresentou um aumento significativo, com uma frequência de 21,6% (INSIDA, 2021). Estes factos sugerem que a maior frequência de colonização, na faixa dos 30-44 anos, observada neste estudo, pode estar associada à alta prevalência de HIV neste grupo, o que aumenta a susceptibilidade à colonização por *P. jirovecii*.

Ademais, com o aumento da idade ocorre o processo da imunossenescência, um estado de “envelhecimento” do sistema imunitário que contribui para o aumento da susceptibilidade às infecções oportunistas, incluindo por *P. jirovecii* (Quiros-Roldan *et al.*, 2024). Em indivíduos idosos HIV+, a imunossupressão causada pelo vírus também acelera esse processo, tornando-os particularmente susceptíveis à infecções oportunistas (Soares *et al.*, 2020).

Entre os pacientes colonizados, os sintomas mais comuns foram a tosse 9 (56,3%) e radiografia do tórax com infiltrado intersticial 6 (37,5%). Estudo realizado num hospital público da Colômbia relatou frequências com uma tendência semelhante, onde entre os pacientes colonizados, 69,4% tinham tosse e 48,2% apresentavam infiltrado intersticial na radiografia do tórax (Aguilar *et al.*, 2021). No presente estudo, a maior parte dos pacientes colonizados não tinham febre 11 (68,8%) e hipoxemia 7 (43,8%). Em contrapartida, no estudo realizado em Colômbia a febre foi apresentada em 76,6% dos pacientes e a hipoxemia foi observada em 13,3% dos pacientes (Aguilar *et al.*, 2021). Esses sintomas são provavelmente relacionados ao SK, uma vez que a PCP e o SK podem ocorrer em simultâneo no pulmão, levando à sobreposição de sintomas e exames imagiológicos (Micali *et al.*, 2022).

Parte dos pacientes 8 (50%) no presente estudo estava sob profilaxia com cotrimoxazol (CTZ) contra *P. jirovecii*. Contudo, esta profilaxia pode não ter contribuído para a diminuição do risco de colonização. A persistência de *P. jirovecii* nesses pacientes pode ser explicada pelo relato impreciso do uso da profilaxia, detecção de organismos não viáveis ou baixa adesão à profilaxia com CTZ (Morris *et al.*, 2004).

Outra possibilidade pode ser o facto de os microrganismos presentes terem sido seleccionados pela profilaxia. O aumento do uso de CTZ como conduta profilática ou terapêutica, foi relacionado ao surgimento de resistência em *P. jirovecii* (Taylor *et al.*, 2012). Em Moçambique, as directrizes de saúde recomendam o uso generalizado de CTZ como profilaxia para todos os pacientes HIV+ com imunossupressão avançada ou nos primeiros 6 meses de TARV.

Embora a contagem de células CD4 seja amplamente reconhecida como um factor preditivo para o desenvolvimento da PCP em pacientes HIV+, o seu papel na previsão da colonização por *P. jirovecii* ainda é controverso (Mekinian *et al.*, 2011). No presente estudo, não foi observada uma relação entre a baixa contagem das células CD4 e a colonização por *P. jirovecii*.

Parte dos pacientes 5 (31, 3%) apresentava contagem de células CD4 > 200 células/ μ L, enquanto 12,5% tinha uma contagem de células CD4 < 50 células/ μ L. Não foi possível obter dados da contagem das células CD4 de 7 (43,8%) dos pacientes, factor que dificultou o estabelecimento da associação entre a colonização e os níveis de CD4 assim como a interpretação dos resultados. No entanto, esses resultados são consistentes com os estudos de Huang *et al.* (2003) e Morris *et al.* (2004), que não encontraram associação significativa entre a colonização por *P. jirovecii* e os níveis de CD4.

De forma geral, os resultados sugerem que a colonização por *P. jirovecii* pode ocorrer independentemente do grau de imunodepressão em pacientes com SK associado à infecção pelo HIV, indicando que esses indivíduos podem actuar como importantes reservatórios de *P. jirovecii*, especialmente em ambientes hospitalares (Perreira *et al.*, 2014). A presença de resíduos fúngicos em indivíduos colonizados com defeitos imunitários pode evoluir para PCP, causar inflamação nas vias respiratórias, e aumentar os casos de mortalidade (Alanio & Bretagne, 2017; Cillóniz *et al.*, 2019; Le Gal *et al.*, 2024).

8. Conclusão

- ◆ No presente estudo foi detectada a comorbilidade, colonização por *P. jirovecii* e Sarcoma de Kaposi em pacientes infectados pelo HIV, através da técnica de *nested* PCR.
- ◆ A colonização por *P. jirovecii* foi detectada principalmente em indivíduos do sexo masculino, na faixa etária dos 30 a 44 anos.
- ◆ A maioria dos indivíduos colonizados apresentavam tosse, radiografia do tórax com infiltrado intersticial e estavam sob tratamento profilático contra *P. jirovecii*.
- ◆ Parte dos indivíduos colonizados eram de baixo risco para a colonização por *P. jirovecii*, sugerindo uma transmissão deste agente a nível da comunidade ou intra-hospitalar.

9. Limitações

O estudo teve como limitação a falta de dados clínicos de alguns pacientes no livro de registo do Hospital Central de Maputo.

10. Recomendações

- ◆ Rastreio microbiológico de *P. jirovecii* em pacientes com Sarcoma de Kaposi e queixas pulmonares.
- ◆ Continuação de análises moleculares para detecção de marcadores de resistência a cotrimoxazol nos casos de colonização por *P. jirovecii*.
- ◆ Realização de pesquisas para estabelecer a relação entre a colonização/infecção por *P. jirovecii* com o desfecho clínico.
- ◆ Implementação da técnica de *nested*-PCR no Hospital Central de Maputo para auxiliar no diagnóstico da Pneumonia por *P. jirovecii*.

11. Referências bibliográficas

- ◆ Abouya Y.L., A. Beaumel, S. Lucas, A. Dago-Akribi, G. Coulibaly, M. N'Dhatz, J. B. Konan, A. Yapi e K. M. De Cock (1992). *Pneumocystis carinii* pneumonia. An uncommon cause of death in African patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 145:617–20.
- ◆ Aderaye G., J. Bruchfeld, M. Olsson e L. Lindquist (2003). Occurrence of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive patients with suspected pulmonary tuberculosis in Ethiopia. *AIDS*, 17:435–40.
- ◆ Aguilar, Y.A., Z.V. Rueda, M.A. Maya, C. Vera, J. Rodiño, C. Muskus e L. A. Vélez (2021). Is It Possible to Differentiate *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia and Colonization in the Immunocompromised Patients with Pneumonia? *J. Fungi*, 7:1036.
- ◆ Alanio, A. e S. Bretagne (2017). *Pneumocystis jirovecii* Detection in Asymptomatic Patients: What Does Its Natural History Tell Us? [Version 1; Peer Review: 3 Approved]. *F1000Research*, 6:739.
- ◆ Aliouat-Denis C. M., C. M. Demanche, C. Aliouat, E. M. Viscogliosi, E. Guillot, J. Delhaes e L. Dei-Cas (2008). *Pneumocystis* species, coevolution and pathogenic power. *Infect Genet Evol*, 8: 708-726.
- ◆ Almeida-Silva F., R. Almeida-Paes, L. Serra-Damasceno, E. Motta-Santos, L. C. Ferreira, L. Pereira Quintella, F. F. Ferreira, M. Medeiros-Muniz e R. M. Zancopé-Oliveira (2023). The conventional diagnosis challenge: Real-time PCR and nested PCR correlation with the scoring system for individuals at high-risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Biomédica*, 43(Supl.1):255-66.
- ◆ Alvaro-Meca A., I. Palomares-Sancho e A. Diaz (2015). *Pneumocystis* pneumonia in HIV-positive patients in Spain: Epidemiology and environmental risk factors. *J Int AIDS Soc.*, 18:19906.
- ◆ Ansari N. A., A. H. Kombe, T. A. Kenyon, N. M. Hone, J. W. Tappero e S. T. Nyirenda (2002). Pathology and causes of death in a group of 128 predominantly HIV-positive patients in Botswana, 1997–1998. *Int J Tuberc Lung Dis*, 6:55–63.
- ◆ Bateman, M., R. Oladele e J. K. Kolls (2020). Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Review of Current Methods and Novel Approaches. *Medical Mycology*, 58 (8): 1015–1028.

- ◆ Batungwanayo J., H. Taelman, S. Lucas, J. Bogaerts, D. Alard e A. Kagame (1994). Pulmonary disease associated with the human immunodeficiency virus in Kigali, Rwanda. A fiberoptic bronchoscopic study of 111 cases of undetermined etiology. *Am J Respir Crit Care Med*, 149:1591–6.
- ◆ Burkes, R. L., A. A. Gal, M. L. Stewart, P. S. Gill, W. Abo e A. M. Levine (1985). Simultaneous Occurrence of *Pneumocystis carinii* Pneumonia, *Cytomegalovirus* Infection, Kaposi's Sarcoma, and B-Immunoblastic Sarcoma in a Homosexual Man. *Cancers and Infections in HIV*, 253(23): 3425-3428.
- ◆ Camilo, F. e R. C. P. Mello (2010). Doença infecciosa parasitária, guia do bolso. Série B. Textos Básicos de Saúde.
- ◆ Cesarman, E., B. Damania, S. E. Krown, J. Martin, M. Bower e D. Whitby (2019). Kaposi Sarcoma. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1):9.
- ◆ 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. *Mem Inst Oswald Cruz*, 1:159-218.
- ◆ Chakaya, J.M., C. Bii, L. Ng'ang'a, E. Amukoye, T. Ouko, L. Muita, S. Gathua, J. Gitau, I. Odongo, J.M. Kabanga, K. Nagai, S. Suzumura e Y. Sugiura (2003). *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Hiv/Aids Patients at an Urban District Hospital in Kenya. *East African Medical Journal*, 80(1):30-35.
- ◆ Chan, E. D. e Iseman MD. Slender (2010). Older Women Appear to be More Susceptible to Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Gen Med*, 7:5–18.
- ◆ Chiliza, N., M. Du Toit e S. Wasserman (2018) Outcomes of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia at a South African referral hospital. *PLoS ONE*, 13(8): e020173.
- ◆ Cillóniz, C., C. D. Míriam, J. Álvarez-Martínez, A. Moreno, F. García, A. Torres e J. M. Miro (2019). *Pneumocystis* pneumonia in the twenty-first century: HIV-infected versus HIV-uninfected patients, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, DOI: 10.1080/14787210.2019.1671823.
- ◆ Dhami A. C. Z. e Z. Cermakova (2015). *Pneumocystis jirovecii*: its history and emergence as a human pathogen. *Reviews in Medical Microbiology*, 26(3):91–97.
- ◆ Downing, R. G. (1984). African Kaposi Sarcoma and AIDS. *The Lancet*, 478-479.

- ◆ Esteves, F. V. C. (2010). *Identificação de Múltiplos Marcadores Polimórficos em Pneumocystis Jirovecii: Relação com a Evolução Clínica*. Tese de Doutoramento. 324pp. Lisboa, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- ◆ Friedman-Kein A., L. Laubenstein e M. Marmor (1981). Kaposi's Sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia among homosexual men – New York and California. *MMVR*, 30:250-252.
- ◆ Gay L., C. Melenotte, I. Lakbar, S. Mezouar, C. Devaux, D. Raoult, M. K. Bendiane, M. Leone e J. L. Mège (2021). Sexual Dimorphism and Gender in Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 12:698121.
- ◆ Godwin, J. D., C. E. Ravin e V. L. Roggi (1982). Fatal *Pneumocystis* pneumonia, *Cryptococcosis*, and Kaposi Sarcoma in a Homosexual Man. *AJR*, 138:580-581.
- ◆ Grabar, S. e D. Costagliola (2021). Epidemiology of Kaposi's sarcoma. *Cancers*, 13:5692.
- ◆ Hartung, T. K., D. Chimbayo , J. J. G. van Oosterhout , T. Chikaonda , G. J. J. van Doornum , E. C. J. Claas , W. J. G. Melchers , M. E. Molyneux e E. E. Zijlstra (2011). Etiology of Suspected Pneumonia in Adults Admitted to a High-Dependency Unit in Blantyre, Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(1):105–112.
- ◆ Hauser P.M. (2019). Is the unique camouflage strategy of *Pneumocystis* associated with its particular niche within host lungs? *PLoS Pathog*, 15(1): e1007480.
- ◆ Hospital Central de Maputo (HCM). Disponível *online*: <https://www.hcm.gov.mz/> (Consultado a 14 de Março de 2024).
- ◆ Huang L., K. Crothers, A. Morris, G. Croner, M. Fox, J. R. Turner, C. Merrifield, S. Eiser, P. Zucchi e C. B. Beard (2003). *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. *J. Eukaryot Microbiol*, 50:616-623.
- ◆ Hviid, C. J., M. Lund, A. Sørensen, E. S. Ellermann, B. Jespersen, M. Y. Dam, J. F. Dahlerup, L. J. Østergaard, T. Benfield, A. L. Laursen e Bissau HIV cohort study group (2017). Detection of *Pneumocystis jirovecii* in oral wash from immunosuppressed patients as a diagnostic tool. *PLoS ONE*, 12(3): e0174012.
- ◆ Instituto Nacional de Saúde (INS). (2023). *Inquérito Nacional sobre o Impacto do HIV e SIDA (INSIDA 2021): Relatório Final*. Maputo, Moçambique.
- ◆ Jensen, L., A. V. Jensen, G. Praygod, J. Kidola, D. Faurholt-Jepsen, J. Chagalucha, N. Range, H. Friis, J. Helweg-Larsen, J. S. Jensen e A. B. Andersen (2010). Infrequent

detection of *Pneumocystis jirovecii* by PCR in oral wash specimens from TB patients with or without HIV and healthy contacts in Tanzania. *BMC Infectious Diseases*, 10:140.

- ◆ Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) (2023). *The Path that ends AIDS: UNAIDS Global AIDS Update 2023*. Geneva, Suíça.
- ◆ Kamanfu G., N. Mlika-Cabanne, P. M. Girard, S. Nimubona, B. Mpfizi e A. Cishako (1993). Pulmonary complications of human immunodeficiency virus infection in Bujumbura, Burundi. *Am Rev Respir Dis*, 147:658–63.
- ◆ Kasturia, S. E., C. Gunthel, C. Zeng e M. L. Nguyen (2017). Severe Kaposi Sarcoma in an Urban Public Hospital. *Pathogenesis*, 33(6): 584-589.
- ◆ Kibiki G.S., P. Beckers, B. Mulder, T. Arens, A. Mueller, M. J. Boerre, J.F. Shao, A.J.A.M. van Der Ven, H. Diefenthal e W.M.V. (2007). Aetiology and presentation of HIV/AIDS- associated pulmonary infections in patients presenting for bronchoscopy at a referral hospital in northern Tanzania. *East African medical journal*, 84:420-428.
- ◆ Lanaspá, M., C. O’Callaghan-Gordon, S. Machevo, L. Madrid, T. Nhampossa, S. Acácio, C. de la Horra, V. Friaza, E. Campano, P. L. Alonso, E. J. Calderón, A. Roca e Q. Bassat (2015). High Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia among Mozambican Children. *Clin. Microbiol. Infect.*, 21: 1018.e9 - 1018.e15.
- ◆ Le Gal, S., P. Bonnet, A. Huguenin, C. Chapelle, P. Boulic, J. M. Tonnelier, M. C. Moal, C. Gut-Gobert, A. Barnier e G. Nevez (2021). The shift from pulmonary colonization to *Pneumocystis* pneumonia. *Med. Mycol*, 59:510–513.
- ◆ Liu C. J., T. F. Lee e S. Y. Rua (2019). Clinical characteristics, treatment outcomes, and prognostic factors of *Pneumocystis* pneumonia in non-HIV-infected patients. *Infect Drug Resist*, 12:1457–1467.
- ◆ López-Sánchez, C., V. Falcó, J. Burgos, J. Navarro, M. T. Martín, A. Curran, L. Miguel, I. Ocaña, E. Ribera, M. Crespo e B. Almirante (2015). Epidemiology and long-term survival in HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in the HAART era: experience in a university hospital and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 94:681.
- ◆ Malin, A. S., L. K. Z. Gwanzura, S. Klein, V. J. Robertson, P. Musvaire e P. R. Mason (1995). *Pneumocystis carinii* pneumonia in Zimbabwe. *Lancet*, 346(11): 1258-1261.

- ◆ Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H. W., Cunningham-Rundles e S. (1981). An Outbreak of Community-Acquired *Pneumocystis Carinii* Pneumonia: Initial Manifestation of Cellular Immune Dysfunction. *N Engl J Med*, 305(24): 1431-8.
- ◆ McDonald, E. G., A. Afshar, B. Assiri, T Boyles, J. M. Hsu, N. Khuong, C. Prosty, M. So, Z. N. Sohani, G. Butler-Laporte e T. C. Lee (2024). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in people living with HIV: a review. *Clínical Microbiology Reviews*, 37(1): 01-33.
- ◆ Meenakshi, R. R. Gowtham e K. Usha (2019). Pneumocystis jirovecii Pneumonia: A Revisit to the Old Malady. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 13 (11): 01-08.
- ◆ Micali, C., Y. Russotto, A. Facciola, A. Marino, B. M. Celesia, E. Pistarà, G. Caci, G. Nunnari, G.F. Pellicanò e V. Rullo (2022). Respiratory Symptoms and Skin Lesions in an HIV-Naïve Patient: A Case Report and Literature Review. *Infect. Dis. Rep.*, 14: 228–24.
- ◆ Ministério da Saúde (MISAU), Instituto Nacional de Estatística (INE) e ICF (2015). *Inquéritos de Indicadores de Imunização, Malária e HIV/SIDA em Moçambique, 2015*. Maputo, Moçambique. Rockville, Maryland, EUA: INS, INE e ICF.
- ◆ Mitchell, D. M., M. McCarty, J. Fleming, F. M. Moss (1992). Bronchopulmonary Kaposi's Sarcoma in Patients with AIDS. *Thorax*, 47:726-729
- ◆ Morris, A. J. D. Lundgren, H. Masur, P. D. Walzer, D. L. Hanson, T. Frederick, L. Huang, C. B. Beard, e J. E. Kaplan. (2004). Current Epidemiology of Pneumocystis Pneumonia. *Emerging Infection Diseases*, 10(10):1713-1720.
- ◆ Morris, A. e K. A. Norris (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clínical Microbiology Reviews*, 25(2):297-317.
- ◆ Morrow, B. M., C. M. Samuel, M. Zampoli, A. Whitelaw e H. J. Zar (2014). *Pneumocystis* pneumonia in South African children diagnosed by molecular methods. *BMC Res. Notes*, 7:26.
- ◆ OMS (2022). *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. Genebra, Suíça.
- ◆ Pereira, R. M., A. L. Müller, R. A. Zimmerman, D. B. Antunes, V. F. Zinn, V. Friaza, C. de la Horra, E. J. Calderón e G. Wissmann (2014). High prevalence of *Pneumocystis*

jirovecii colonization among HIV-positive patients in southern Brazil. *Medical Mycology*, 52:804–809.

- ◆ Pozniak, A. L., A. S. Latif, P. Neill, S. Houston, K. Chen e V. Robertson (1992). Pulmonary Kaposi's sarcoma in Africa. *Thorax*, 47:730-733.
- ◆ Quiros-Roldan, E., A. Sottini, P. G. Natali e L. Imberti (2024). The Impact of Immune System Aging on Infectious Diseases. *Microorganisms*, 12:775.
- ◆ Riebold D., D. O. Enoh e T. N. Kinge (2014). *Pneumocystis jirovecii* colonisation in HIV positive and HIV-negative subjects in Cameroon. *Trop Med Int Heal*, 19: 643–655.
- ◆ Ruocco, E., V. Ruocco, M. L. Tornesello, A. Gambardella, R. Wolf e F. M. Buonaguro (2013). Kaposi's sarcoma: Etiology and pathogenesis, inducing factors, causal associations, and treatments: Facts and controversies. *Clin. Dermatol.* 31:413–422.
- ◆ Redhead, S. A., M. T. Cushion, J. W. Frenkel e J. R. Stringer (2006). *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and typifications. *J. Eukaryot. Microbiol*, 53:2–11.
- ◆ Sacarlal, J. e D.W. Denning (2018). Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Mozambique. *J. Fungi*, 4:75.
- ◆ Salzer, J. F. H., G. Schäferc, M. Hoenigle, G. Günthera, C. Hoffmannh, B. Kalsdorfa, A. Alanio e Christoph Langea (2018). Clinical, Diagnostic, and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Respiration*, DOI: 10.1159/000487713.
- ◆ Senécal J., E. Smyth, O. Del Corpo, J. M. Hsu, A. Amar-Zifkin, A. Bergeron, M. P. Cheng, G. Butler-Laporte, E. G. McDonald e T. C. Lee (2022). Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 28:23–30.
- ◆ Skalski J. H., T. J. Kottom e A. H. Limper (2015). Pathobiology of *Pneumocystis* pneumonia: life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS Yeast Res*, 15(6):6-18.
- ◆ Soares, L.S., M. S. Espíndola, F. A. Zambuzi, L. J. Galvão-Lima, M. C. Cacemiro, M. R. Soares, B. A. Santana, R. T. Calado, V. R. Bollela e F. G. Frantz (2020). Immunosenescence in chronic HIV infected patients impairs essential functions of their natural killer cells. *Int. Immunopharmacol.* 84:106568.

- ◆ Song, Y., Y. Ren, X. Wang e R. Li (2016). Recent Advances in the Diagnoses of *Pneumocystis* Pneumonia. *Med. Micol. J.*, 57(5):111-116.
- ◆ Tang F. F., X. S. Zhao, L. P. Xuta (2018). Utility of flexible bronchoscopy with polymerase chain reaction in the diagnosis and management of pulmonary infiltrates in allogeneic HSCT patients. *Clin Transplant*, 32: e13146
- ◆ Taylor, S. M., S. R. Meshnick, W. Worodria, A. Andama, J. L. Davis, A. Cattamanchi, S. den Boon, S. D. Yoo, C. D. Goodman e L. Huang (2012). Low Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* Lung Colonization in Ugandan HIV-Infected Patients Hospitalized with Non *Pneumocystis* Pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 72(2): 139–143.
- ◆ Thomas CF e A. H. Limper (2004). *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med*, 350:2487–2498.
- ◆ Vera, C. e Z. V. Rueda (2021). Transmission and Colonization of *Pneumocystis jirovecii*. *J. Fungi*, 7:979.
- ◆ Vilanculo, N. A. M. (2017). *Detecção Molecular de Pneumocystis jirovecii e Histoplasma Capsulatum em Pacientes Infectados por HIV no Hospital Central de Maputo, Moçambique*. Tese de Mestrado. 80pp. Maputo-Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.
- ◆ Wakefield, A. E., F. J. Pixley, S. Banerji, K. Sinclair, R. F. Miller, E. R. Moxon, e J. M. Hopkin (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*, 336: 451-453.
- ◆ Wasserman, S., M. E. Engel, R. Griesel e M. Mendelson (2016). Burden of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected adults in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 16:482.
- ◆ Weyant, R. B., D. Kabbani, K. Doucette, C. Lau e C. Cervera (2021). *Pneumocystis jirovecii*: a review with a focus on prevention and treatment. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, DOI: 10.1080/14656566.2021.1915989.
- ◆ Wills, N.K., D. S. Lawrence, E. Botsile, M. W. Tenforde e J. N. Jarvis (2021). The Prevalence of Laboratory-Confirmed *Pneumocystis Jirovecii* in HIV-Infected Adults In África: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medical Mycology*, 59 (8): 802–812.
- ◆ Yarchoan, R. e T. S. Uldrick (2018). HIV-Associated Cancers and Related Diseases. *N Engl J Med.*, 378(11): 1029–1041.

- ◆ Yoo, D. J., K. H. Lee, P. Munderi, K. C. Shin e J. K. Lee (2005). Clínical and Bronchoscopic Findings in Ugandans with Pulmonary Kaposi's Sarcoma. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 20:290-294.

12. Anexos: Aprovação ética do estudo principal com título: Preditores de Sarcoma de Kaposi Pulmonar no Hospital Central de Maputo

	
<p>REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE MINISTÉRIO DA SAÚDE COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE IRB00002657</p>	
<p>Exma. Senhora Dra. Elizabeth Nunes HCM</p>	
<p>Ref: 374/CNBS/19</p>	<p>Data 06 de Agosto de 2019</p>
<p>Assunto: Renovação da aprovação do protocolo de estudo intitulado: "<i>Preditores de Sarcoma de kaposi Pulmonar no Hospital Central de Maputo</i>"</p>	
<p>O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou o pedido de renovação anual da aprovação do protocolo de estudo intitulado: "<i>Preditores de Sarcoma de kaposi Pulmonar no Hospital Central de Maputo</i>"; e sobre o mesmo o CNBS chegou a seguinte conclusão:</p>	
<p>Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a continuação do estudo, o CNBS dá a autorização.</p>	
<p>Todavia, recomenda aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.</p>	
<p>A aprovação da renovação tem a validade de um ano, terminando esta a 06 de Agosto de 2020. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.</p>	
<p>Sem mais de momento, queiram aceitar as nossas cordiais saudações.</p>	
<p> A Vice-Presidente Doutora Esperança Severina</p>	
<p>C/c: Comité Institucional de Bioética para Saúde da FM&HCM</p>	
<p>Endereço: Ministério da Saúde - 2º andar dto Av. Eduardo Mondlane / Salvador Allende Maputo - Moçambique</p>	<p>C.Pos Telefone: +258 82 41 E-mail: cnbsmocambique@gn</p>