



*Esta desgravação contempla a aula das 11h e parte da aula das 12h (uma vez que neste dia houve duas aulas de micro) de modo a abranger o tema calendarizado!!! As secções do texto a Comic Sans são curiosidades referidas pelo Professor.
Bom trabalho!*

Micoses disseminadas

Fazendo aqui uma destriça muito clara, porque quem for ler isto na véspera do exame é capaz de ficar baralhado, e dizer: “afinal, o que são micoses disseminadas...está no mesmo capítulo que Blastomicose, Coccidioidomicose?”

Já há muitos anos que existem micoses disseminadas e que existem fungos que tipicamente são agentes de micoses disseminadas ou sistémicas, mas esses fungos, curiosamente são endémicos de determinadas áreas geográficas do globo, nomeadamente do Hemisfério Sul e, em particular, pela importância que isso tem na literatura médica, dos EUA. Obviamente, que sempre lhes deram muito destaque porque é um problema de saúde pública importante dos EUA. Aquilo que nós europeus, e os americanos começam a aceitar, é classificado hoje em dia como micoses sistémicas endémicas, são endémicas de determinadas áreas geográficas, muito embora, e eu chamo a atenção para isso, abrangem áreas geográficas enormes. Podem abranger todo um continente, por exemplo todo o continente Americano: América do Norte e América do Sul. Nós, na Europa, só temos de algumas dessas micoses que hoje e na próxima aula vamos ver: coccidioidomicose, blastomicose, histoplasmosse, só temos de importação.

Mas, enquanto há 20, 30, 50 anos, 100 anos, micoses disseminadas na Europa eram relativamente raras, as causadas por fungos que até são endémicos na população microbiana do corpo humano, por exemplo por *Candida*, tornam-se cada vez mais frequentes, e até, hoje em dia, os próprios americanos começam a dar.... Por exemplo, a edição mais recente do *Murray* procedeu a uma revisão profunda da micologia e criou um capítulo, desenvolvendo de forma adequada aquilo que são as candidoses sistémicas, ou as candidoses disseminadas, aspergilose invasiva, os chamados fungos emergentes destas micoses disseminadas, mantendo, obviamente um capítulo importante das tais micoses endémicas.

Como estas são, por uma questão geográfica, mais importantes entre nós vamos começar a tratar destas micoses disseminadas, também chamadas oportunistas, contrapondo às ditas endémicas. Oportunistas porquê? Porque têm muito a ver com a condição basal, com o estado imunológico, com os estados fisiológicos do hospedeiro... Não são as únicas: nós vamos falar de Candidose, de Aspergilose. Também é importante a Criptococose, a Pneumocistose (*Pneumocystis* – se é que isto é um fungo, depois vamos ver porquê...) e depois vamos tecer algumas considerações sobre alguns agentes emergentes.

Esta imagem já apareceu aqui. Lembrem-se sempre disto... lembrem-se de alguém que, ou porque é prematuro, por exemplo, ou porque é idoso e portanto, o seu status imunológico, a sua condição física, a sua normal homeostasia não está muito bem

e que qualquer coisinha é capaz de fazer desequilibrar a carroça. Ora, esta qualquer coisinha pode ser um fungo, por exemplo uma levedura aparentemente inofensiva que faz parte das nossas populações microbianas normais desde o nascimento ou um fungo filamentosso, um bolor, que anda pelo ar, que nós temos em casa, que está nesta sala, que é perfeitamente ubíquo, mas que naquele hospedeiro é capaz de desequilibrar a carroça. “O Homem é ele e a sua circunstância”.

1. *Candida*

É uma levedura e como todas as leveduras, divide-se por gemulação. Há mais de 150 espécies de *Candida* patogénicas para o Homem. Dentro destas há *Candidas* com nomes de bebidas, de plantas, mas estas *Candida* são os agentes da linha da frente:

- *Candida albicans*;
- *Candida glabrata**;
- *Candida tropicalis*;
- *Candida krusei*;
- *Candida dubliniensis*;
- *Candida guilliermondii*;
- *Candida lusitanae*;
- *Candida parapsilosis*.



C. albicans



C. krusei



C. tropicalis

*As leveduras do género *Cândida* multiplicam-se pela formação de blastósporos, pseudo-hifas e hifas septadas. A *Cândida glabrata*, uma levedura implicada nas infecções do trato urinário e no desenvolvimento de doença sistémica em indivíduos debilitados, é uma exceção, uma vez que só produz células leveduriformes.

Mais uma vez são agentes ubíquos, quer no corpo humano, quer no ambiente. Durante muitos anos e ainda hoje, a maior parte da comunidade científica acredita sobretudo na génese endógena destas infecções. É verdade que são muitas vezes infecções endógenas, quer seja por *Candida albicans* ou por espécies não *albicans*. (Quando me refiro às outras digo, muitas vezes, *Candida* não *albicans*, significa que pode ser qualquer uma daquelas). Mas também é verdade, e isto quer para *albicans* quer para as outras, que elas são ubíquas na natureza e cada vez mais se começa a aceitar mais uma possível fonte exógena e até transmissão cruzada da infecção por estes agentes. Durante muitos anos, e só é assim em algumas circunstâncias, a *Candida albicans* é considerada o principal agente de infecção. Mas, isto é uma daquelas verdades que é cada vez menos verdade e já não é verdade em algumas situações concretas, como vamos ver. Mas isto era uma daquelas verdades de La Palice e ainda muita gente vive com isto na cabeça (era quase como dizer que só o *Staphylococcus aureus* é patogénico! – vocês já não saem daqui de forma nenhuma com essa noção, e também não saiam daqui com a noção que *C. albicans* é o principal patogénio). De facto, *C. albicans* não é o principal patogénio, porque houve mudanças muito significativas na epidemiologia nos últimos anos: houve um aumento das infecções devidas a espécies não *albicans*, nomeadamente

Candida glabrata, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, e agora está a prestar-se atenção à *Candida lusitanae*. Isto tem implicações muito sérias, não por uma questão de taxonomia, mas sim por questões de índole terapêutica porque a resistência aos antifúngicos nestas espécies não *albicans* é muito maior; são resistências intrínsecas aos antifúngicos que estão disponíveis e, portanto, é um dos principais problemas de índole terapêutica. Que tem a ver com a emergência destas espécies não *albicans*.

Candidoses disseminadas

Quem será o alvo principal? Obviamente que, aparentemente, todos os que estamos aqui nesta sala estamos num estado de saúde pelo menos compatível com o estar aqui sentado durante 50 ou 60 minutos, mas, sobretudo quem está internado nas UCI, quem foi submetido a um transplante nomeadamente de medula óssea (o que é curioso, porque eu diria que elas têm sobretudo apetência para os transplantados de órgãos sólidos), os doentes neoplásicos, os que foram submetidos a cirurgia gastrointestinal (porque foi aberto o tubo digestivo que é um dos reservatórios naturais destas espécies), os doentes queimados e os prematuros, são os alvos principais destas infecções, e tem a ver sobretudo com o uso do que nós chamamos de implantes médicos, dispositivos implantáveis e implantes, que podem ser desde uma prótese valvular cardíaca a um cateter arterial ou um cateter venoso central que fica no doente mais ou menos tempo; a própria algália, um tubo endotraqueal. Portanto, são aqueles dispositivos que são usados rotineiramente em virtualmente todos os doentes que estão admitidos numa UCI ou que são submetidos àquelas intervenções tipo transplantes. Tem a ver também, por outro lado com a administração massiva de antimicrobianos, numa tentativa de “esterilizar” o doente e isso causa profundos desequilíbrios nos normais ecossistemas, porque se elas fazem parte das populações microbianas normais, existem factores de antibiose que as regulam (é aquela velha história de dizer que existem em determinados locais 1000 bactérias anaeróbias para cada uma aeróbia, porque existem mecanismos de regulação e também existem mecanismos de regulação e antibiose entre bactérias, por exemplo e estes fungos ou estas leveduras nestes locais. A partir do momento em que se façam desaparecer as bactérias, causam-se profundos desequilíbrios daqueles normais ecossistemas e os fungos passam a proliferar – noção de micoses oportunistas.

Actualmente, começam a aparecer evidências de que estas manobras, e estas manobras não são apenas propriamente as manobras físicas, mas também as manobras farmacológicas – as terapêuticas, os fármacos que são usados na recuperação e ressuscitação cardiovascular, por exemplo catecolaminas, infusões de colóide, infusões de substâncias que se administram ao doente para manter a volemia, também alguns agentes sedativos que ou estimulam directamente o desenvolvimento destes agentes ou promovem a sua resistência por mecanismos que não são exactamente os mesmos.

Os Cuidados Intensivos, são um ambiente muito propício a este tipo de infecções e eu costumo apresentar esta imagem quando tenho que falar de Cuidados Intensivos, costumo dizer que esta foi a melhor UCI que vi até hoje, porque não tinha doentes. Habitualmente, nas UCI está um doente em pior ou melhor estado, mas está cheio de tubos, com óptimas condições para se pousarem microrganismos, independentemente de serem fungos, bactérias... São-lhe administradas n infusões, mas, se ainda por cima, tivermos poucos cuidados de higiene (ex: UCI militar no Sul do Líbano) e segurança, piora tudo. E mais, se lhe forem administrados fármacos, as tais terapêuticas de ressuscitação cardiovascular, imunossupressão, porque vai ser submetido a um

transplante, em que a prednisolona é um exemplo de um corticóide administrado em doses francamente generosas a este tipo de doentes, estão criadas as condições para que este doente desenvolva, por um lado, imunossupressão, por outro lado, a este doente também lhe é administrada, à partida, profilaxia antibacteriana e portanto, tem criadas óptimas condições para que venha a desenvolver fungos, não em 24, não em 48 horas, mas sobretudo ao fim de alguns dias, porque isto leva tempo. Isto é uma das razões pelas quais eu já apresentei aqui esta noção de que até aos anos 80 nós mantínhamos vivo um doente crítico durante uma semana, depois, passamos a manter por duas semanas e agora mantemos por 3 ou 4.

Falemos, agora, muito em particular, da UCI de queimados. O doente, além de estar ventilado, de estar algaliado, de receber cateteres centrais, tem uma destruição brutal da sua barreira cutâneo – mucosa e, este doente também esteve em choque hipovolémico, logo, tem óptimas condições quer para agentes que sejam endógenos quer para agentes que venham do ambiente que o podem colonizar e infectar. Este doente tem óptimas condições, só pelo facto da queimadura, de vir a desenvolver uma destas infecções.

Agora, reparem aqui: um doente que tem uma franca destruição das suas mucosas e tem este tipo de implantes: uma sonda nasogástrica e um tubo endotraqueal, estes doentes têm verdadeiras auto-estradas para, por exemplo fungos que existam aqui ao nível destas mucosas possam, por um lado, invadir sistemicamente o doente ou, por outro lado possam invadir em profundidade porque colonizam esses tubos endotraqueais.

Um prematuro muito pequeno tem ainda várias imaturidades, mas uma que é notória é do sistema imunológico e, como também tem que estar ventilado e receber cateteres centrais e ser algaliado e tem que receber alimentação por uma sonda nasogástrica (questão dos implantes), tem óptimas condições para desenvolver estas micoses. Mais uma vez, acho que fica bem patente o conceito de micose oportunista.

Mas nós continuamos nas *Candida*, e só para vos dizer que a candidose nas UCI aumentou entre 10-20% e isto era aquilo que se dizia no início dos anos 2000 e não se conseguiu ultrapassar uma mortalidade entre 35-50%, o que é francamente frustrante.

No HSJ, foi conduzido um estudo, entre 1 de Janeiro e 31 de Dezembro de 2004, em doentes com quadros clínicos compatíveis com fungemia e verificou-se aquilo que se verifica em todos os hospitais universitários, ou seja, que os fungos, nomeadamente *Candida* representam o 4º agente mais frequentemente isolado do sangue, estamos a falar em hemoculturas e portanto, não há dúvida que estamos a falar em micoses sistémicas, em micoses invasivas. Em termos de espécies, o que se encontrou foi o seguinte: 35,04% é de *C. albicans* (francamente abaixo dos 50% - há pouco tempo dizia-se que mais de 95% das fungemias eram por *C. albicans*); a 2ª espécie mais frequente (e aqui já há variações epidemiológicas de país para país) é *C. parapsilosis*. Esta última é mais vezes exógena, mais vezes ambiental, e isto põe o problema da transmissão cruzada da infecção ambiental. O professor também chamou a atenção para *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*, este último não tem nada a ver com *Candida*; é um fungo que infecta particularmente doentes HIV positivo. Ora, nós temos uma população grande de doentes HIV positivo.

Factores de risco para fungemia por *Candida*

- internamento há mais de 24 horas numa UCI;
- presença de um cateter urinário;
- presença de sonda nasogástrica;

- uma hemocultura prévia positiva para bactérias (isto significa que foi assumido que tinha uma infecção sistêmica por uma bactéria e foi tratado com antibacterianos, a seguir, se sobreviveu, veio a desenvolver uma sépsis por um fungo).
- alimentação parentérica;
- proteção gástrica (significa anular a barreira gástrica ácida do estômago, na tentativa de se impedir o aparecimento de úlceras gástricas, úlcera de stress; ao anular a barreira gástrica, o estômago fica colonizado);
- doentes submetidos a quimio e radioterapia;
- trombocitopenia (a associação com baixa de plaquetas foi um dado novo, só há uma descrição em todo o mundo e neste momento não há explicação para isto).

Mortalidade por fungemia por *Candida*

Mais uma vez, não basta dizer que é *Candida*, há que ter a noção de qual é a espécie. A mortalidade, no caso de *C. albicans* foi de 46%, *C. parapsilosis* foi 30%, *C. tropicalis* 53% e *C. glabrata* 62%. Atinge todas as idades, mas atingiu sobretudo, no caso deste hospital os casos de idades mais avançadas (61 aos 70 e mais de 70 anos).

Vamos fazer aqui um parêntese porque eu sei que quando falaram de micoses cutâneas não foram apresentadas as candidoses cutâneas. Obviamente que, também disse isso logo desde o início, há poucos fungos que sejam exclusivamente agentes de micoses cutâneas e outros que sejam exclusivamente agentes de micoses subcutâneas ou agentes de micoses sistêmicas. Muitas vezes eles começam por um lado e disseminam para outros locais. Os fungos do género *Candida*, até este advento da Medicina moderna, quase que só causavam exclusivamente micoses cutâneas, porque num passado recente (há 50/70 anos atrás) não se faziam transplantes, não se mantinham os doentes vivos as semanas que se mantêm hoje, não se efectuavam aquelas manobras terapêuticas invasivas e, portanto, às vezes morriam uns doentes em fase terminal com micoses disseminadas (a candidose sistêmica já foi descrita há mais de 100 anos, mas foram achados, eram casos que apareciam descritos na literatura, eram casos esporádicos). Aquilo que tinha importância efectivamente eram estas candidoses cutâneo – mucosas, sobretudo da cavidade oral e da cavidade vulvo-vaginal e também do tubo digestivo (candidose esofágica).



Candidoses cutâneas, orais e esofágicas

Candidose cutânea

Uma das formas mais frequentes, deve-se ao atingimento das pregas do canto da boca que o povo designa habitualmente como boqueira. Há atingimento de pregas cutâneas, sobretudo se elas forem extensas e sobretudo se existirem factores de risco; por exemplo, quem é diabético, nas mulheres após a menopausa, quem tem algumas doenças do colagénio mas na comunidade em geral aquilo que é mais frequente é a associação destas candidoses mucosas e a diabetes mellitus. Causam lesões cutâneas, com aspecto mais húmido, mais exsudativo do que por exemplo aquelas micoses causadas pelos dermatófitos que têm um aspecto mais seco. Atingem as axilas, a área interdigital, porque é uma levedura que precisa de humidade, precisa de calor.

Estas lesões passaram a ser mais frequentes e mais expressivas sobretudo nos indivíduos HIV positivos e com SIDA. Mesmo que o infectado HIV não desenvolva uma infecção sistémica, ele tem candidose das mucosas, cutâneas crónicas e tem de manter a terapêutica antifúngica desde que a manifesta, até ao fim da sua existência, porque se ele suspende a terapêutica antifúngica aquela micose recidiva/reactiva.

Candidose mucocutânea crónica

Não é muito frequente a *Candida* atingir as unhas, principalmente a tala da unha. Tipicamente o que causa é uma perioniquia, doença que pode atingir o sulco ungueal, entretanto edemaciar e se não for tratada, atingir a tala da unha. Ao contrário dos dermatófitos que atingem do sentido distal da unha para o proximal, esta atinge-a no sentido contrário. Pode aparecer sobretudo em diabéticos. Começa por atingir a perioniquia e depois o bordo livre da unha, isto é uma situação curiosa descrita há muitos anos que se associa a uma imunodeficiência de tipo T mas só a nível cutâneo, a chamada candidose mucocutânea crónica. Ainda não está esclarecido o mecanismo pelo qual este aparece, sabe-se que está associado a uma imunodeficiência mas curiosamente estes doentes têm atingimento cutâneo generalizado e não desenvolvem fungemia, não têm micose invasiva. Este é um dos buracos negros no mundo da patologia da *Candida* é a candidose mucocutânea crónica. Estes têm periodicamente perioniqueo e ioniqueo mas têm formas cutâneas de *Candida* generalizada.

Candidose vulvo-vaginal

A candidose vulvo-vaginal tem a ver com um exsudado vaginal com leucorreia esbranquiçada, com cheiro a leite coalhado. Estamos a ver uma imagem de uma senhora com uma candidose cutânea muito extensa que começou na cavidade vaginal e como a senhora era diabética, começou a passar para o períneo e depois disseminou-se pela região lombar.

Porque é que estas candidoses cutâneas acontecem na mulher?

Isto acontece na mulher durante a gravidez e após a menopausa. Estava relacionado com o uso de contraceptivos orais numa fase em que eles tinham uma quantidade de hormonas, que já não são aquelas como estão ajustadas hoje em dia, e tinha a ver também com a relação que tinha com outros possíveis microorganismos. Por exemplo, lembram-se da vaginose bacteriana, lembram-se da *gardnerella vaginalis* daquela proliferação de anaeróbios. Os ginecologistas descreviam que as mulheres tinham um síndrome em pingue-pongue, que era assim: numa fase tinham candidose

vaginal e depois aquilo passava e passados uns tempos manifestavam vaginose bacteriana. Há mulheres que até sabem pelo cheiro que vem aí a vaginose bacteriana. Isto significa que havia qualquer coisa de incompatibilidade entre *Candida* e vaginose bacteriana. Ora, a *Candida* é um fungo e os fungos não gostam nada de anaerobiose. A vaginose bacteriana tem uma proliferação de anaeróbios, produzem muita putrescina e muita cadaverina e aí está a explicação para aquele cheiro típico.

Já há muitos anos que os nossos colegas dos cuidados intensivos criaram uma teoria da descontaminação selectiva dos doentes. Um doente entrava para os cuidados intensivos, administravam-lhe antibacterianos tópicos, antibacterianos por via sistémica mas tentavam poupar ao máximo os anaeróbios, porque os anaeróbios têm um efeito protector. Claro que esta teoria de descontaminação selectiva resultava aparentemente durante uns meses, durante um ano mas, ao fim de um ano, havia superinfecções por microorganismos ambientais envolventes. Contudo, havia uma noção muito importante que eles não sabiam explicar, que era o facto de os anaeróbios terem um efeito protector e nós explicamos o seguinte: são estas aminas, putrescina e cadaverina, produzidas pelos anaeróbios, elas não matam nas quantidades em que são produzidas na vaginose bacteriana, não matam a *Candida* nem as espécies de *Candida albicans*, mas impediam-nas de formar hifas, de formar pseudohifas, impediam-nas por exemplo de filamentar e de invadir os tecidos, ou seja eram um mecanismo regulador, depois quando houvesse um desequilíbrio dos anaeróbios, isto era um mecanismo natural de antibiose.

Um outro é, por exemplo o *Lactobacillus*, hoje sabe-se que existem mas não se sabe muito bem quais são. Estamos aqui a modelar *in vitro* aquilo que se passará na cavidade vaginal e também na cavidade oral porque lá também existem *Lactobacillus* e também existem anaeróbios. Existem “maus” *Lactobacillus* e “bons” *Lactobacillus*, estes “bons” *Lactobacillus* produzem lactocinas que, para além de promoverem um pH ácido, são capazes de inibir o crescimento de por exemplo, um fungo do género *Candida*. O problema está em dizer “Então porque é que não recolonizam as mulheres?”, “Porque é que não recolonizam estas cavidades orais com estes *Lactobacillus*?” Porque eles não aderem ao epitélio e portanto não podem recolonizar.

Colheita de amostras

Independentemente de ser candidose sistémica ou de ser candidose cutâneo mucosa, vamos fazer colheita de amostras, se pensarem em diagnóstico microbiológico o que é que nós vamos colher em termos de amostras clínicas?

- Sangue;
- Urina;
- Expectoração (se o doente tiver um atingimento pulmonar);
- LCR.

Agora queria distinguir duas coisas, como é que deve ser feita a **pesquisa de *Candida* nos produtos microbiológicos?** E como é que deve ser feita a **identificação final de *Candida*?**

Tradicionalmente, assenta essencialmente no exame microscópico e no exame cultural. E nós teremos tempo para isto, não será crítico, se forem situações pouco graves. Mas estas infecções sistémicas, nos transplantados, nos doentes dos cuidados intensivos, nos queimados, não são graves, são gravíssimas! Estes doentes morrem e morrem em muito pouco tempo e portanto teria todo o interesse que nós

conseguíssemos fazer o diagnóstico o mais rapidamente possível. É importante saberem que está disponível um teste de aglutinação com látex com anticorpos monoclonais e pode ser utilizado directamente nos produtos biológicos e também pode ser utilizado PCR (método de biologia molecular).

1. Exame microscópico

O exame microscópico tradicionalmente baseia-se num exame a fresco entre lâmina e lamela e isto tem interesse sobretudo para os exsudados das mucosas e, mais uma vez lembrem-se que o fungo quando está a invadir quando está a ser patogénico apresenta este aspecto. Isto é uma levedura, mas é uma levedura que está a gemelar mas uma levedura também emite hifas e pseudohifas, isto é o aspecto que ela apresenta nos tecidos, por exemplo isto é o aspecto que apresenta num exsudado vaginal. Aqui têm a célula do epitélio pavimentoso, aqui está o aspecto dela a filamentar. Vocês não digam de forma nenhuma que isto é um fungo filamentoso, isto é uma levedura.

O teste de aglutinação pelo látex é um teste como qualquer outro teste, é um teste até muito mais conveniente para um clínico porque pode ser utilizado à cabeceira do doente ou após ter sido colhido o produto biológico. Só precisam de juntar uma gota do produto biológico com uma gota do reagente e ver se existe a formação de um precipitado floculado, uma reacção de aglutinação.

2. Exame cultural

O exame cultural clássico, é um exame que demora 24 a 48 horas até aparecer uma colónia que é igual em pelo menos mais de 100 espécies de *Candida*. Por exemplo, aquilo que está ali não seria o aspecto típico, de forma nenhuma, de algumas espécies de *Candida* mas por exemplo, aquilo pode ser um *saccharomyces cerevisiae* e aquilo pode ser um *cryptococcus neoformans*. Quando preparam o esfregaço para colorar vão haver células cocóides de gram positivos. Terá bastante mais interesse se forem utilizados os meios de cultura chamados **meios cromogénicos** (podem e devem ser utilizados na sementeira primária), em que a levedura cresce mas só é possível a identificação das principais patogénicas, por exemplo, estas colónias grandes são igual a *Candida albicans*, estas colónias azuis são por exemplo iguais a *Candida tropicalis*, estas são iguais a *Candida glabrata*. Isto não é verdade em 100% dos casos, mas já nos dá uma pista muito importante, pode-nos ajudar muito a direccionar a terapêutica e sobretudo temos a evidência de outra coisa...Quantas espécies eu tenho aqui diferentes? Aparentemente só tenho uma, as colónias são todas iguais mas eu garanto-lhes que esta colónia pode ser *Candida albicans*, esta que está aqui pode ser *Candida tropicalis*, esta pode ser *Candida glabrata* e a outra pode ser *saccharomyces cerevisiae* mas, como a microbiologia clássica se baseia em dizer que “colónias com o mesmo aspecto são em principio o mesmo microorganismo”, eu não sei. Se eu utilizar um meio cromogénico eu posso ter várias colónias simultaneamente, reparem, aqui tenho colónias verdes e tenho colónias brancas aqui metidas no meio, ou seja, isto também é uma das razões pelas quais pode existir discrepância entre os resultados *in vitro* e os resultados *in vivo*. É que nós julgamos que a infecção é causada por um só agente, seleccionamos uma colónia daquelas, seleccionamos um microorganismo, um fungo, e afinal o doente está a ser infectado por dois fungos. Isto não é tão raro como se possa pensar.

Em termos de identificação, se forem ler um livro antigo, vão ver provas de fermentação de carboidratos e a formação de candidosporos. Vão ver que não têm qualquer interesse para o caso, isto é a mesma coisa, vão ver que demora 48 a 72 horas, é como atirar uma moeda ao ar, 50% verdade e 50% mentira e sabem com a formação de candidosporos, que demora uma semana, aquilo que sabem pela prova da filamentação ao fim de 2 horas ou de 4 horas.

A **prova da filamentação** quando é positiva diz-nos que aquela levedura é uma *Candida albicans*, quando é negativa diz-nos que não é uma *Candida albicans*, que pode ser uma das outras 150 espécies de *Candida* não *albicans* ou que nem sequer é uma *Candida*, ou seja, esta é uma prova de tudo ou nada que quando positiva é muito boa mas, se negativa, não é nada informativa. A prova da filamentação diz que se vocês retirarem daquela placa de petri, por exemplo, que estava no meio de Saboraud, uma colónia, a suspenderem em soro humano e a encubarem a 37 °C e se, ao fim de duas horas, forem observar e ela for negativa e se de seguida observam ao fim de 4 horas este resultado, passadas as 4 horas não tem valor. Se a partir daquelas blastoconídeas houver a formação daqueles tubos germinativos, então, isto é uma prova positiva. Isto diz-nos que é uma *Candida albicans* e isto não tem valor passadas as 4 horas porque ao fim de algumas horas, poucas espécies que não a *Candida albicans*, por exemplo, a *Candida tropicalis* pode formar tubos germinativos, no fundo o que está a formar é o início de uma hifa verdadeira.

A alternativa era executar este **auxonograma** que é uma prova que demora também de 48 a 72 horas. As provas auxonográficas são provas de assimilação de carboidratos, que eram feitas manualmente, hoje em dia já existem métodos automáticos de identificação ou baseados num sistema de carboidratos ou baseados em algumas provas bioquímicas, levam algum tempo, já são mais rápidos e este é o método standard é o método padrão de identificação de microorganismos. Mais uma vez, isto leva tempo, depende do exame cultural.

Naqueles doentes que estão efectivamente com infecção grave, que estão em risco de vida tinha todo o interesse conseguir detectar o microorganismo em tempo real, em tempo útil e isto só é possível de uma maneira na prática, que é pela **detecção de ácidos nucleicos**, mas mais uma vez os PCRs que nós temos disponíveis, espécie de PCR panfúngico que diz assim, “este doente está infectado por um fungo mas eu não sei se é *Candida albicans* ou se é *Candida* ou se é outro tipo de fungo.

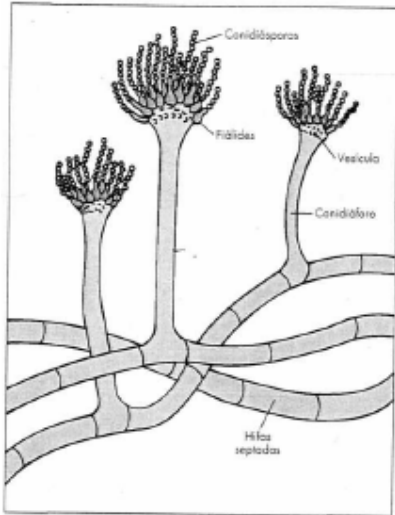
Posso também utilizar **primers que são dirididos para *Candida albicans***. E se não é uma *Candida albicans*? E se é uma das outras cento e tal? A técnica mais recente, neste momento, que ainda não está disponível, é um **sistema de multiplex por PCR** que detecta aquelas 8 espécies mais frequentemente patogénicas para o Homem em simultâneo. E mais uma vez tem demonstrado que em alguns casos estão presentes mais do que uma espécie, por exemplo, pode estar uma *Candida glabrata* associada a uma *Candida albicans*, pode estar uma *Candida guilliermondii* associada a uma *Candida lusitaniae*.

Outra alternativa, que já foi mais promissora do que é hoje em dia, é conseguir **detectar subprodutos constituintes da parede da *Candida*** no sangue e, portanto, seria uma prova que estaria a causar uma infecção sistémica. Mais uma vez uma coisa muito importante, quer num caso, quer no outro, eu não tenho a prova evidente que este microorganismo esteja vivo. Não constitui prova biológica que esteja vivo, quer

detectando o seu material da parede quer detectando o seu material genético, eu não tenho prova que ele esteja vivo.

2. *Aspergillus*

Fungo filamentososo



Esta é a estrutura de reprodução assexuada de *Aspergillus* em cultura. As conídeas são esporos libertados e transmitidos pelo ar para muito longe e para diferentes locais.

Género *Aspergillus*

- mais de 100 espécies conhecidas,
- muito ubíquos (até mais ubíquos que *Candida* porque como fungo filamentososo tem mais condições e porque produz esporos, de resistir a condições adversas mais do que uma levedura). Portanto, é impossível, virtualmente, encontrar um lugar na terra, dentro ou fora de paredes onde não existam esporos de *Aspergillus*. Há histórias curiosas que dizem que quem tinha algum interesse na egiptologia, aqueles indivíduos que descobriram as pirâmides do Egito e que penetraram nas câmaras dos faraós sabem que os primeiros exploradores morreram misteriosamente passadas algumas horas e há pouco tempo foi analisado o corpo de um e chegou-se à conclusão que ele tinha uma grande quantidade de esporos de *Aspergillus* no pulmão e punham a hipótese de que provavelmente morreu com uma aspergilose pulmonar alérgica. Contudo puseram a hipótese de que os egípcios já soubessem bastante sobre microbiologia e que colonizaram de propósito aquelas câmaras com fungos. Isto é pouco provável, não acredito, agora o que aconteceu foi que se criou ali um bom ambiente, um bom nicho ecológico, por estar ali uma câmara enorme, húmida, com calor (externo), mas com uma certa humidade, um sítio onde estavam milhares de milhões de esporos de *Aspergillus*. Entrou ali, inalou aquilo e portanto desenvolveu a seguir uma aspergilose alérgica.

Apesar de se conhecerem mais de 100 espécies patogénicas, acredita-se que *Aspergillus fumigatus* é o principal patógeno humano. Curiosamente estão descritos poucos casos de doença humana para além de 5 ou 6 espécies: *terreus*, *nidulans*, *flavus*...

A mortalidade da aspergilose invasiva não tratada é de 100%, e a mortalidade mesmo tratada é muito alta.

Representação à escala numérica, do tamanho de diferentes partículas que podem atingir as vias aéreas

É curioso que no passado, houve uma primeira teoria a dizer que só os *Aspergillus fumigatus* é que causavam aspergilose invasiva porque é aquele que tem o esporo de tamanho certo para atingir o alvéolo e ficar lá dentro.

A verdade é que qualquer coisa a atingir e a depositar-se no alvéolo, tem de ter o tamanho certo para conseguir manter-se na corrente aérea e não ser depositado nas coanas nasais, nos brônquios principais, na traqueia, etc. e também não ser pequena demais para entrar, chegar ao alvéolo, manter-se na mesma em suspensão na corrente aérea e voltar a sair quando o ar for exalado (que é o que acontece, por exemplo, com alguns vírus, os vírus depositam-se lá mas apenas se estiverem dentro de células ou se estiverem aderidos a partículas maiores. A maior parte das bactérias que têm deposição a nível do alvéolo por exemplo, *Corynebacterium*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella* e *Pseudomonas* são mais pequenas do que os esporos de *Aspergillus* e de *Bacillus anthracis*. Aquela teoria do pó branco que foi enviado nos E.U.A. só funciona em termos de causar carbúnculo por via inalatória se for um bacilo geneticamente modificado para produzir um esporo de tamanho certo porque senão eles são depositados mais cedo.

É necessário atender a certas características dos doentes: tipo de doentes, circunstâncias em que eles estão, os actos a que eles são submetidos e depois onde é que eles vivem e o problema das pessoas se aperceberem que isto é um microrganismo ubíquo e que se reproduz com muita facilidade em qualquer ambiente que a comunidade médica como também gente do ambiente, do design hospitalar, de engenharia e de arquitectura, se apercebeu que isto é acima de tudo um **problema de higiene ambiental, é um problema do ambiente hospitalar.**

Primeiro preocuparam-se essencialmente com o ar e com a análise permanente da qualidade do ar e portanto a maior parte destes doentes é padrão no H.S.J., nomeadamente os queimados, os transplantados de medula (não é verdade para os transplantados de órgãos sólidos mas se calhar deveria ser) devem estar instalados num ambiente onde exista fluxo laminar que é como quem diz à beira da câmara de fluxo laminar do laboratório onde o ar é filtrado e é sempre dirigido de forma a que não exista reposição e recirculação do mesmo ar sobre o mesmo doente.

Eu costumo dizer que tudo isso é muito importante mas se não houver uma boa política de higiene e de acesso a essas instalações, se uma colónia destes fungos se instalar dentro daquelas instalações, e isto é verdade para os *Aspergillus* como para outros fungos filamentosos, se esta sala tiver fluxo laminar mas se estivesse com a porta sempre aberta e as pessoas sempre a sair e a entrar e se viessem com roupa da rua e trouxessem livros e comida e as tais plantas o fungo instala-se começa a multiplicar-se dentro daquela unidade e depois não adianta o fluxo laminar porque ele já lá está e é verdadeiramente um cavalo de Tróia.

Estamos a falar de um agente que, ao contrário de *Candida*, são agentes tipicamente exógenos estes nunca fazem parte das populações microbianas do corpo humano, são agentes tipicamente exógenos. O que eles são é indestrutíveis ou então muito difíceis de destruir e são-no porque conseguem colonizar rigorosamente tudo. E neste momento digo-vos que isto é um problema de higiene ambiental e de segurança ambiental, não é só um problema de higiene do ar mas também de higiene de superfícies (paredes, bancas, cadeiras) e igualmente um problema de higiene da água, que é outro aspecto muito importante.

Assim, cada vez mais se aceita que o pulmão não é a única porta de entrada dos *Aspergillus fumigatus*, não é a única fonte de contágio para uma aspergilose invasiva e que por exemplo a contaminação cutânea de pequenas feridas e de pequenas escarificações que ficam na pele quando a pele está lacerada (por exemplo, um doente com um cateter venoso periférico que foi, durante vários dias macerado com fita adesiva), pode ser o ponto de entrada de uma aspergilose invasiva. Sobretudo se um cateter fica vários dias, varias semanas e às vezes as pessoas esquecem-se e deixam ficar um cateter em, por exemplo, uma unidade de queimados do H.S.J. nenhum cateter central está mais do que 15 dias, nem que tenha que ser introduzido um outro através do mesmo orifício.

Síndromes clínicas

Aspergilose alérgica

Colonização secundária – situação clínica crónica, com pequeno desconforto, com excepção de alguns surtos ocasionais de hemoptise.

Aspergilose sistémica/invasiva

Diagnóstico

Quanto à Aspergilose invasiva, a colheita das amostras tem de ser a mais invasiva possível, é brutal eu dizer isto mas o melhor método de diagnóstico de aspergilose invasiva é a necrópsia, é uma autópsia é o método último de confirmar que era uma aspergilose invasiva.

Não tendo a autópsia, o ideal seria obter biopsias, amostras de tecido, ser uma espécie de exame anatomopatológico. Mas, o que se faz de facto é colher várias amostras e nomeadamente, aquilo que é padrão em relação à aspergilose invasiva:

- lavado broncoalveolar, com as limitações que eu já disse;
- expectoração, tem pouco interesse;
- sangue, invariavelmente as hemoculturas vão ser negativas nos casos das aspergiloses invasivas;
- LCR, nos casos em que existe suspeita de atingimento meníngeo;
- biopsias.

O que nós procuramos neste momento no sangue é analisar por PCR o ADN do fungo ou, por outro lado, utilizando determinados metabolitos do fungo e constituintes da parede, nomeadamente o galactomanam. É um teste que tem alguma sensibilidade muito embora tenha um problema de especificidade. Existem vários kits disponíveis mas geralmente não funciona sozinho. Tenta-se, então, encontrar no sangue do doente o ADN do fungo, utilizando PCR em tempo real com o objectivo de tentar quantificar ou seja, dizer que “este doente tem uma carga fúngica mais elevada do que outro doente” e no mesmo doente ir avaliando a carga fúngica ao longo do tempo e complementando esta detecção do ADN do fungo com esta pesquisa dos galactomanam.

O exame tradicional, sobretudo no caso destas micoses invasivas vem muito à posteriori. Aquilo que é clássico é fazer crescer um fungo filamentosos sobre um meio de agar e portanto há o aparecimento de uma colónia e depois neste fungo saber se ele é

um *fumigatus*, se é um *niger*, se é um *flavus*, se é um *terreus* ou um *nidulans* tem muito de artesanal.

A classificação tradicional dos fungos filamentosos é muito mais artesanal do que é a classificação de uma levedura ou de uma bactéria, tem muito a ver com a macro e micromorfologia. A macromorfologia tem a ver com o aspecto do micélio aéreo e com o aspecto do micélio vegetativo de uma colónia e a micromorfologia é vista em cultura em lâmina, o fungo é posto a crescer numa camadinha fina entre a lâmina e a lamela e depois é que se vê o aspecto dos conidióforos, como é que estão inseridas as fiálides (células em que se formam as conideas), certas fiálides são multiciliadas, são biciliadas. É um trabalho demorado e só um micologista com experiência é capaz de fazer a distinção das principais espécies patogénicas de *Aspergillus*, mas, para classificar aquelas mais de 100 espécies de *Aspergillus*, só há 3 centros de referência no mundo capaz de o fazer.

Que fique bem claro que, quer seja *Candida*, quer seja *Cryptococcus* ou qualquer outra levedura, as leveduras são células que estão permanentemente vivas, viáveis. O esporo da levedura, digamos assim, que é o blastoconídea, é uma célula que tem metabolismo permanente. No caso de *Aspergillus*, no caso em geral de todos os fungos filamentosos, tudo parte de um pressuposto diferente. O que é inalado, assumindo que a principal porta de entrada é a via inalatória, são os esporos que são células quiescentes e este esporo tem que germinar e este momento é crítico, porque se eu inalar esporos mas eles não germinarem (isto será o que acontece a todos nós, inalamos mas eles não germinam porque são expelidos e porque antes de germinarem existem mecanismos de actuação local que impedem a sua germinação); a única coisa que nós podemos ter se inalarmos uma grande quantidade de esporos é um episódio de asma brônquica. Este aspecto da germinação é o aspecto mais crucial, é o início de tudo, é isto que está na génese da aspergilose invasiva. Tudo aquilo que consiga bloquear esta germinação consegue bloquear o avanço para uma aspergilose invasiva, também tudo aquilo que for capaz de acelerar este fenómeno de germinação (tempo para os fungos é capacidade de sobrevivência) permite melhor escape à acção dos macrófagos, dos polimorfonucleares neutrófilos. Este aspecto de germinação é crucial, porque só depois de germinar é que vai alongar estas hifas, vai fazer esta ramificação para depois atingir uma fase de plateau, formar conidióforos, produzir novos esporos e o ciclo complementa-se assim. Só há bem pouco tempo é que isto foi descrito, se nós formos comparar, por exemplo, *Aspergillus fumigatus* com *flavus* e *níger*, a rapidez de germinação, ao fim de 6h só 10% dos *Aspergillus níger* é que estão germinados, mas já estão 50 % dos *Aspergillus fumigatus*. Ao fim de 10 horas a diferença que existe ainda é brutal. Isto significa que *Aspergillus fumigatus* naturalmente, sem adição de mais nada germina mais depressa e, se a germinação é o aspecto inicial na formação de hifas e as hifas são cruciais para invadir, *Aspergillus fumigatus*, por natureza está mais bem dotado intrinsecamente para ser capaz de invadir um hospedeiro.

Importa saber o que acontece se se fizer variar a temperatura. Viu-se o que é que acontece se se fizer germinar a 20°C (“modelo” daquilo que é considerado a temperatura ambiente), a 30°C e depois às temperaturas do meio interno. Por exemplo, a 30°C não existe grande diferença em termos de eficiência de germinação entre *Aspergillus fumigatus*, *flavus* e *níger*. Aos 36°C a germinação de *Aspergillus níger* começa a diminuir, a germinação de *Aspergillus flavus* ainda aguenta um bocadinho a subida de temperatura até aos 36°C, mas depois descai brutalmente e a do *Aspergillus fumigatus* é cada vez melhor. Este aspecto é um aspecto muito importante, isto mostra que *Aspergillus níger* está bem adaptado a viver no ambiente, mas num ambiente que nem

sequer seja um ambiente tropical, num ambiente moderado em termos de temperatura. *Aspergillus niger* é muito bom para viver nas paredes, nos livros, nas especiarias, em cima das plantas. *Aspergillus flavus* é capaz também de viver e germinar, mas quando chega aos 37°C a sua eficiência descai brutalmente e a do *Aspergillus fumigatus* cada vez melhora mais.

Um doente que está na UCI, que foi transplantado pode começar a desenvolver uma “infecçãozinha” de pouca importância, como uma infecção urinária ou um resfriado... a temperatura começa a subir. Este é um dos mecanismos que pode explicar porque é que o *flavus* e o *niger* estão pouco dotados para serem capazes de invadir o meio interno de um indivíduo que está com hipertermia porque, por exemplo desenvolveu uma infecção por *Staphylococcus aureus* ou por um *Staphylococcus coagulase negativo*, o tal indivíduo que teve uma hemocultura prévia positiva para bactérias. O que acontece aos 42-43°C, não foi estudado, porque a estas temperaturas o doente morre. Tem interesse sabermos o que se passa aos 50-60°C, não para estudar a sobrevivência dos doentes, mas sim processos de esterilização. Basta isto para se ver que *Aspergillus fumigatus* é aquele que está mais dotado, perante um indivíduo que está hipertérmico a invadir o meio interno. Importa mais uma vez salientar que, à medida que vamos mantendo doentes imunodeprimidos, em mau estado físico vivos, quando eles escaparam do risco de serem infectados por um *Aspergillus fumigatus*, são depois invadidos por um *Aspergillus niger* ou por um *flavus*, que no ambiente até é mais frequente que o *Aspergillus fumigatus*.

Conclusão: *Candida* e *Aspergillus*.

Comparando o que é um agente classicamente entendido como endógeno (na maioria dos casos as candidoses sistémicas têm origem endógena) e estas Aspergiloses que são exógenas. Se formos ver o que aconteceu ao longo da década de 90, vamos ter que percentualmente, não quer dizer que diminuíssem em número absoluto os casos, mas percentualmente as infecções invasivas por *Candida* diminuíram e aumentaram as infecções por *Aspergillus* e quando chegou ao final dos anos 90 sofreu uma inflexão por estarem a aumentar infecções por fungos emergentes, são fungos filamentosos. Isto é o reflexo da moderna prática médica de transplantação, sobretudo os transplantes de stem cells (transplantes de precursores da medula óssea, que é uma coisa que está muito em voga nos grandes centros universitários dos EUA e do Canadá) e representa que, acima de tudo, nós estamos mais uma vez a conseguir manter vivos e efectuar transplantes em doentes que eram intratáveis há bem poucos anos atrás.

Para terminar e para terem a noção do que é que representa em termos de mortalidade, há um estudo que comparou o que aconteceu no final dos anos 80 e depois no final dos anos 90 em termos de mortalidade para *Candida*, comparando a mortalidade em indivíduos que desenvolveram infecções sistémicas por *Candida* comparativamente à mortalidade, isto em infecções nosocomiais, e estas infecções hospitalares, basicamente a maioria delas em cuidados intensivos, comparando com a mortalidade num grupo controlo. Para os *Aspergillus* não foi possível fazer isto porque nem sequer havia documentada a mortalidade no início dos anos 90. Nestes 10 anos, tirando a mortalidade em UCI, genericamente, até diminuiu, passou de 19% para 12%, mas a mortalidade das infecções por *Candida* sobe de 57% para 61%. A chamada mortalidade crua, mortalidade directa passou de 38% para 49%. Isto traduz que, apesar de termos melhores resultados em UCI durante estes anos, estivemos a admitir doentes cada vez mais graves que, portanto nem sequer eram admitidos em UCI, nem se punha essa hipótese de serem tratados antes dos anos 88.

Para *Aspergillus* a mortalidade era, neste estudo, muito mais elevada, relativamente a *Candida*, de um modo global era de 85%.

3. Pneumocistose

Trata-se de uma micose oportunista causada pelo fungo unicelular *Pneumocystis jiroveci*, dantes chamado *Pneumocystis carinii* (apesar de na maioria dos livros ainda estar escrito *P. carinii*, *P. jiroveci* é a designação actual e correcta para este agente). Assim, está associada a várias condições clínicas de debilitação, como a idade, a imunossupressão congénita ou iatrogénica e SIDA. O microrganismo oportunista está presente em muitos indivíduos com doença completamente assintomática. Já há muitos anos se sabe que este pode ser um habitante (quase) normal das vias respiratórias superiores e até das inferiores, podendo ser encontrado nos alvéolos, sob a árvore respiratória. Simplesmente, tornou-se extremamente importante com o advento da SIDA e foi associado a muitos episódios terminais da doença, por atingimento pulmonar na forma de pneumocistoses pulmonares.

A transmissão de um hospedeiro para outro, aparentemente, ocorre através da inalação de gotículas e contacto íntimo (o fungo infecta também roedores, mas estes não funcionam como reservatórios para transmissão ao Homem).

O *P. jiroveci* é atípico, quando comparado com outros fungos em termos de características fenotípicas, diferentes morfologias encontradas nos tecidos infectados e resistência a antifúngicos.

O que acontece no seu ciclo de vida é que existem duas células, duas formas haplóides, que se conjugam e formam uma estrutura diplóide. Seguidamente, esta sofre meiose, que se caracteriza por ter inclusões de glicogénio, e forma aquilo a que se chama um cisto. Este cisto vai amadurecendo, e este amadurecimento implica a formação de, à volta do núcleo do cisto, várias meioses e, portanto, originam-se formas haplóides que depois se libertam, por excitação. Nenhum outro fungo que se reproduz assim; quem o faz são alguns parasitas procariotas unicelulares, grupo onde, durante muito tempo, se incluiu o *P. jiroveci*.

A mudança de posição taxonómica do microrganismo assenta em argumentos actuais como a parede do cisto se assemelhar à dos fungos e, principalmente, devido ao ARNr ser notavelmente homólogo ao dos fungos.

Muita literatura considera-o ainda um parasita, mas, à luz dos factos referidos é indubitavelmente um fungo. Contudo, note-se que não há envolvimento de esporos ou hifas, tudo se processa exactamente como se de um parasita se tratasse.

O microrganismo é incultivável mas a sua identificação pode ser realizada em cortes de biópsia pulmonar, lavados brônquicos ou expectoração, corados pelo Giemsa (entre outros métodos) ou fazendo pesquisa de imunofluorescência directa com anticorpos monoclonais.

[Foi mostrada uma imagem de um lavado alveolar, onde se viam pequenas células com algum citoplasma, correspondentes às tais formas haplóides do *P. carinii*].

Joana Almeida
Joana Leal
Joana Medeiros
(turma 6)