



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

ANA LUÍSA RIBEIRO BRANCO

***ASPECTOS PARTICULARES DAS PNEUMONIAS
ATÍPICAS: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO
MICROBIOLÓGICO***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSOR DOUTOR CARLOS ROBALO CORDEIRO**

MARÇO/2011

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

*Aspectos Particulares Das Pneumonias Atípicas:
Métodos De Diagnóstico Microbiológico*

Artigo de revisão

Autor: Ana Luísa Ribeiro Branco

E-mail: ana.branco.vc@gmail.com

Orientador: Professor Doutor Carlos Manuel Silva Robalo Cordeiro
Pneumologista dos Hospitais da Universidade de Coimbra
Professor associado com agregação à Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra

ÍNDICE

1 RESUMO	1
2 ABSTRACT	2
3 GLOSSÁRIO	3
4 INTRODUÇÃO	4
5 OBJECTIVOS	8
6 DESENVOLVIMENTO	9
6.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO INDIRECTO - TÉCNICAS SEROLÓGICAS.....	10
6.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO.....	21
6.2.1 CULTURA.....	21
6.2.2 TÉCNICAS DE DETECÇÃO DIRECTA DE ANTIGÉNIOS	22
6.2.3 TÉCNICAS DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	23
6.3 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO E INDIRECTO	36
7 CONCLUSÕES.....	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 RESUMO

As Pneumonias Atípicas representam cerca de 20 a 28% das pneumonias adquiridas na comunidade e têm como agentes etiológicos o *Mycoplasma pneumoniae*, a *Chlamydia pneumoniae*, a *Legionella* spp., a *Coxiella burnetii*, a *Francisella tularensis* e a *Chlamydia psittaci*. Estes microrganismos atípicos não são sensíveis à antibioterapia habitualmente utilizada na pneumonia por bactérias típicas e exigem métodos de diagnóstico distintos. O objectivo deste trabalho consistiu na pesquisa, compilação e análise da literatura recentemente publicada no campo dos métodos de diagnóstico microbiológico actualmente utilizados na clínica e das novas técnicas desenvolvidas. Apesar de as técnicas serológicas constituírem ainda o método mais utilizado nos laboratórios clínicos, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos têm tido um papel de crescente importância pela sua elevada sensibilidade e rapidez, indo de encontro ao principal objectivo da aplicação dos métodos microbiológicos na prática clínica: a intervenção na decisão terapêutica. A cultura, apesar de difícil, demorada e exigente, continua a ser o método de diagnóstico de eleição na pneumonia por *Legionella* spp., a par da detecção de antígenos do serogrupo 1 da *L. pneumophila* na urina. O uso combinado de técnicas directas e indirectas provou aumentar a acuidade diagnóstica acrescentando, porém, complexidade e um aumento de custos. No futuro, será necessária a análise da relação custo-benefício do investimento no diagnóstico microbiológico das pneumonias atípicas por contraposição ao recurso a uma terapêutica empírica.

Palavras-chave: Pneumonia atípica; microrganismos atípicos; diagnóstico microbiológico; técnicas de amplificação molecular; serologia; cultura.

2 ABSTRACT

The Atypical Pneumonias accounts for approximately 20 to 28% of community-acquired pneumonias and are caused by *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* and *Chlamydia psittaci*. These atypical organisms do not respond to the antibiotic therapy commonly used with typical bacterial pneumonias and require different methods of diagnosis. The aim of this work consisted of research, compilation and analysis of recently published literature concerning the methods of microbiological diagnosis currently used and the new techniques developed. Although serological techniques are still the most widely used method in clinical laboratories, the nucleic acid amplification techniques have an increasingly important role due to its high sensitivity and speed, fulfilling the main reason of using microbiological methods in clinical practice: intervention in the therapeutic decision. The culture, although difficult, time consuming and fastidious, remains the diagnostic method of choice in pneumonia caused by *Legionella spp.*, together with the detection of *L. pneumophila* serogroup 1 antigens in urine. The combined use of direct and indirect techniques has proven to increase diagnostic accuracy, however, with increased complexity and costs. Future studies will be necessary to analyze the cost-benefit of intensive microbiological investigation of atypical pneumonia as opposed to an empirical therapy.

Keywords: Atypical pneumonia, atypical organisms, microbiological diagnosis, molecular amplification techniques, serology, culture.

3 GLOSSÁRIO

CF – Complement fixation

EIA – Enzyme immunoassay

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

HRCT – High-resolution computed tomography

IFA – Immunofluorescence assay

LAMP – Loop-mediated isothermal amplification

NASBA – Nucleic acid sequence based amplification

PA – Particle agglutination

PAC – Pneumonia adquirida na comunidade

PCR – Polymerase chain reaction

RT-NASBA – Real-time nucleic acid sequence based amplification

RT-PCR – Real-time polymerase chain reaction

4 INTRODUÇÃO

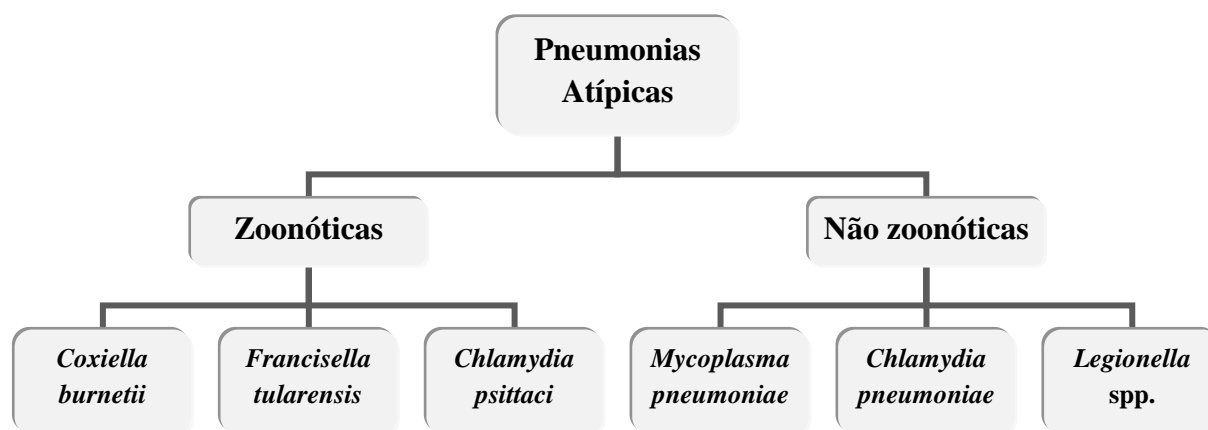
A pneumonia adquirida na comunidade (PAC) é habitualmente definida como uma inflamação aguda do parênquima pulmonar, de origem infecciosa, num doente que adquiriu essa infecção em ambulatório. Excluem-se dessa classificação pneumonias associadas aos cuidados de saúde, como as adquiridas em hospitais ou lares, bem como as pneumonias de aspiração e as que afectam doentes imunodeprimidos. É uma doença com grande incidência, associada a elevada morbilidade e a uma mortalidade considerável, sobretudo entre os doentes idosos e entre aqueles que necessitam de hospitalização (Sociedade Portuguesa de Pneumologia, 2003).

A designação ‘pneumonias atípicas’ é usada para definir as PAC que têm como agentes etiológicos determinados microrganismos, ditos ‘atípicos’. Estas podem ser divididas clinicamente em zoonóticas e não zoonóticas, consoante sejam ou não transmitidas por animais. Entre os patógenos comumente implicados nas pneumonias atípicas zoonóticas encontram-se a *Coxiella burnetii*, a *Francisella tularensis* e a *Chlamydia psittaci*. As pneumonias atípicas não zoonóticas têm como agentes etiológicos o *Mycoplasma pneumoniae*, a *Chlamydia pneumoniae* e a *Legionella* spp. Excluem-se desta designação pneumonias causadas por vírus, micobactérias, parasitas ou fungos, bem como as pneumonias bacterianas típicas (figura 1) (Cunha BA, 2008a).

As recomendações da Sociedade Portuguesa de Pneumologia, a par de outras Sociedades Científicas (American Thoracic Society e British Thoracic Society), são contrárias ao uso do termo ‘pneumonia atípica’ devido ao seu valor histórico e à sua desadequação face ao conhecimento actual. Na sua origem (início do século XX), o termo referia-se a uma pneumonia cuja etiologia era desconhecida, de características variáveis e distintas do quadro

clínico típico de uma pneumonia, e de curso clínico irregular. Hoje em dia, o termo é usado para nomear a pneumonia causada por um grupo específico de patógenos relativamente comuns, ou como alusão a uma síndrome clínica distinta cuja existência tem sido difícil de demonstrar (Murdoch DR, 2009). Neste trabalho, a designação ‘pneumonia atípica’ pretende apenas referir-se à infecção do parênquima pulmonar por microrganismos que se distinguem pelo seu crescimento intracelular, pelas manifestações extra-pulmonares que provocam, pelos meios de diagnóstico distintos que exigem e pela sua insensibilidade aos antibióticos β -lactâmicos.

Figura 1 – Classificação clínica das pneumonias atípicas.



Origem: Cunha BA (2008) Atypical pneumonias: current clinical concepts focusing on Legionnaires' disease. *Curr Opin Pulm Med* 14:183-194.

Com frequência, o termo ‘pneumonia atípica’ refere-se à infecção pelos microrganismos não zoonóticos: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila*. Para além de muito menos frequentes, as pneumonias atípicas zoonóticas só ocorrem em indivíduos que tiveram contacto próximo e recente com um vector zoonótico apropriado (Cunha BA, 2008a). O *M. pneumoniae* e a *C. pneumoniae* são as causas mais frequentes de PAC em jovens adultos tratados em ambulatório, sendo porém responsáveis por um reduzido número de hospitalizações. A principal motivação para o seu tratamento reside na prevenção

de complicações e no facto de se julgar que podem precipitar crises de asma ou estar na origem do aparecimento de doenças crónicas como asma pós-PAC, esclerose múltipla e doença coronária arterial. No entanto, a *Legionella* assume um papel preponderante como causa comum de PAC severa, estando associada a elevada mortalidade e morbilidade, pelo que o seu rápido diagnóstico presuntivo ou definitivo se reveste de particular importância (Cunha BA, 2006).

Diversos critérios clínicos, radiológicos e laboratoriais têm sido usados estudados isoladamente como predictores etiológicos das PAC, tendo demonstrado um valor limitado (Korppi M, et al. 2008). Uma característica clínica importante dos microrganismos atípicos, que os distingue das bactérias pneumónicas típicas, é o facto de provocarem uma infecção sistémica que primária ou secundariamente envolve os pulmões. Este facto é responsável pelas manifestações extra-pulmonares características das pneumonias atípicas. As manifestações gastrointestinais são frequentes com o *M. pneumoniae* e a *Legionella*, nomeadamente diarreia aquosa e dor abdominal. O *M. pneumoniae* é também causa comum de manifestações do tracto respiratório superior como otite, miringite bolhosa e faringite não-exsudativa, e de manifestações dermatológicas como o eritema multiforme. Por outro lado, a laringite é característica da infecção por *C. pneumoniae*. Anormalidades do sistema nervoso central, cardíacas, hepáticas, renais e electrolíticas sugerem infecção por *Legionella*. É de salientar que se deve valorizar o padrão de envolvimento extra-pulmonar e não as alterações pontuais (Cunha BA, 2006). A radiografia do tórax é considerada uma referência para o diagnóstico de pneumonia, revelando densidades alveolares ou intersticiais sugestivas; carece, porém, de especificidade no diagnóstico etiológico (Zaki e Goda, 2009). O mesmo problema se coloca com a utilização de testes laboratoriais não específicos, como a determinação dos títulos de crioaglutininas, a quantificação das transaminases séricas ou a medição de parâmetros inflamatórios. Apesar do seu valor histórico como primeiro teste laboratorial

utilizado no diagnóstico da pneumonia atípica por *Mycoplasma pneumoniae* (Cunha CB, 2010), hoje em dia sabe-se que os títulos elevados de crioaglutininas não são específicos desta infecção, podendo ocorrer em outras situações infecciosas e não infecciosas (Cunha BA, 2008b). Krüger et al. (2009) estudou a correlação entre a elevação dos parâmetros inflamatórios (proteína C reactiva, procalcitonina e contagem de leucócitos) e a etiologia das PAC, tendo verificado que apesar de níveis altos serem mais sugestivos de pneumonias bacterianas típicas do que atípicas, estes não servem o propósito da predição etiológica.

Um estudo recente (Arnold FW, et al. 2007) detectou uma incidência de 22% de pneumonias atípicas entre 4337 doentes com PAC de 21 países, variando de 20 a 28% entre as quatro diferentes regiões geográficas (EUA/Canadá; Europa; América Latina; Ásia /África). Contudo, uma maior variação foi encontrada na proporção de doentes tratados empiricamente para pneumonia atípica (10 a 91%), reflectindo as diferenças na ênfase que é dada à cobertura de patógenos atípicos nas *guidelines* de cada país. O estudo mostrou ainda uma redução no tempo de estabilização clínica, menor duração da hospitalização e diminuição na mortalidade de doentes hospitalizados por CAP submetidos a terapêutica empírica inicial para microrganismos atípicos. Estes dados elucidam-nos acerca do peso das pneumonias atípicas dentro do grupo das PAC, bem como da sua distribuição relativamente uniforme a nível mundial. Por outro lado, sugere-nos que o desenvolvimento de métodos de diagnóstico microbiológico adequados, com disponibilização de resultados num curto espaço de tempo, será importante para contornar a problemática da terapêutica empírica, facilitando a decisão terapêutica e trazendo indubitáveis benefícios, nomeadamente em termos de tempo de hospitalização e mortalidade.

5 OBJECTIVOS

Este trabalho de revisão visou abordar a Pneumonia Atípica num dos seus aspectos de maior interesse e controvérsia na actualidade: os métodos de diagnóstico microbiológico. Teve como objectivo reunir e sistematizar a informação mais recente e actualizada sobre as técnicas actualmente utilizadas e as novas técnicas desenvolvidas, publicada a partir de Janeiro de 2005. Para o efeito foi realizada uma pesquisa inicial de literatura em Abril de 2010, a nível de uma base de dados electrónica (PubMed, Medline), que foi revista em Março de 2011.

Da primeira pesquisa bibliográfica resultaram 99 artigos, dos quais 44 foram incluídos nesta revisão. Da segunda pesquisa resultaram 9 novos artigos, dos quais 2 foram escolhidos para complementar a selecção anterior.

Foram seleccionados artigos que abordassem a temática do diagnóstico microbiológico da pneumonia atípica num contexto de PAC, em ambulatório e no internamento. Excluíram-se artigos sobre estudos efectuados em doentes imunodeprimidos.

6 DESENVOLVIMENTO

Para além do interesse em termos epidemiológicos, pretende-se que os métodos de diagnóstico microbiológico auxiliem a decisão terapêutica ou, se esta já estiver instituída, permitam fazer alterações ou o reajuste terapêutico de forma a diminuir o espectro de acção da antibioterapia, se tal for necessário (Sociedade Portuguesa de Pneumologia, 2003).

Segundo Carrillo et al. (2009), “um diagnóstico incorrecto ou tardio pode levar ao aumento da morbidade e da mortalidade causada pela pneumonia, e a disponibilidade de um teste microbiológico rápido e preciso para verificar a etiologia é imperativo”.

A escolha do melhor método de diagnóstico a utilizar deve ser feita com base no grupo etário do doente, no seu contexto epidemiológico, na existência ou não de contacto com animais infectados, no grau de severidade da doença e na sua apresentação clínica.

Os métodos de diagnóstico microbiológico utilizados no esclarecimento etiológico da PAC baseiam-se na identificação directa ou indirecta do microrganismo causador. Os métodos de diagnóstico directos englobam a cultura do patógeno, a detecção de antígenos seus e a identificação de sequências específicas de ácidos nucleicos. A identificação indirecta do microrganismo ocorre através da medição da resposta imune específica do hospedeiro contra o agente agressor (Pignanelli S, et al. 2009; Gouriet F, et al. 2008).

Serão abordados em primeiro lugar os métodos indirectos, por serem tradicionalmente os mais utilizados com a finalidade do diagnóstico microbiológico da pneumonia atípica. Os métodos directos, por englobarem técnicas mais recentes e com maiores perspectivas futuras de desenvolvimento, serão abordados em segundo lugar. Por fim, será revista a literatura relativa a estudos comparativos entre métodos de diagnóstico microbiológico directo e indirecto.

6.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO INDIRECTO - TÉCNICAS SEROLÓGICAS

A serologia é o método primário de diagnóstico microbiológico das pneumonias atípicas. Isso deve-se à facilidade na recolha das amostras de soro e a uma grande disponibilidade de testes serológicos, mas também às limitações da cultura e ao elevado custo das técnicas de amplificação molecular. A evidência indirecta da presença do microrganismo atípico faz-se através da demonstração de uma seroconversão ou de títulos crescentes de anticorpos (Gouriet F, et al. 2006), pelo que são necessárias amostras emparelhadas, respectivamente da fase aguda e da fase de convalescença. Porém, títulos elevados de anticorpos IgM específicos para *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* numa amostra isolada de um doente com PAC podem também ser diagnósticos (Cunha BA, 2006). Este princípio tem sido aplicado no desenvolvimento de técnicas serológicas de diagnóstico rápido, por exemplo.

A diferenciação entre uma infecção aguda e uma infecção persistente ou uma portação assintomática só é possível através do recurso à serologia, pelo que mesmo uma cultura ou um teste de PCR positivos necessitam dos resultados do teste serológico para uma correcta interpretação (Atkinson, et al. 2008).

Fixação do complemento

A fixação do complemento (CF) é a técnica clássica da serologia, desenvolvida no início do século XX e ainda utilizada em muitos laboratórios. Durante muitos anos foi a única técnica serológica disponível para a detecção de anticorpos anti-*M. pneumoniae*, onde ainda é considerada uma técnica de referência. Apesar de ser rigorosa e padronizada, é também demorada e carece de sensibilidade e especificidade. Devido à sua limitação na detecção das

diferentes classes de anticorpos e à tendência para reacções cruzadas, tem sido substituída por técnicas de enzimoimunoanálise (Gouriet F, et al. 2006).

Aglutinação de partículas

Muito utilizada no diagnóstico da sífilis, pela detecção de anticorpos contra o *Treponema pallidum*, a aglutinação de partículas (PA) é uma técnica serológica útil também na detecção precoce e específica de anticorpos contra a *Francisella tularensis*. A microaglutinação e a aglutinação em tubo são as técnicas de referência no diagnóstico da tularemia. Detecta anticorpos IgG e IgM, porém a detecção de IgM parece ser muito mais eficiente. Um aumento de quatro vezes no título de anticorpos entre amostras emparelhadas, com títulos de pelo menos 1/160 para a aglutinação em tubo e 1/128 para a microaglutinação, são diagnósticos de infecção por *F. tularensis*. Quando há uma elevada concentração de anticorpos a técnica pode falhar e o resultado do teste será falsamente negativo, o que representa uma importante limitação da técnica (Gouriet F, et al. 2006).

Imunofluorescência

As técnicas de imunofluorescência (IFA) são as mais utilizadas na detecção de anticorpos contra bactérias. Têm sido usadas para identificar infecções por *L. pneumophila*, *C. burnetii*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* e *F. tularensis* (Gouriet F, et al. 2006). A IFA permite a detecção e a quantificação de diferentes classes de imunoglobulinas, como IgG, IgM e IgA, através da utilização de fluorocromos diferentes. Contudo, apresenta algumas limitações, como a subjectividade na leitura dos resultados, as reacções não-específicas, a fraca reprodutibilidade e o facto de ser uma técnica laboriosa e demorada (Gouriet F, et al. 2008).

Para o diagnóstico serológico das infecções agudas por *C. pneumoniae* e *C. psittaci* a IFA é a técnica de eleição, utilizando-se como critério diagnóstico um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos entre amostras emparelhadas num intervalo de 3-4 semanas. Porém, um único título de anticorpo IgM $\geq 1:16$ ou de IgG $\geq 1:512$ podem ser sugestivos de infecção aguda (Gouriet F, et al. 2006).

No caso da infecção por *Legionella* spp. a IFA é dos métodos serológicos mais usados, a par da ELISA, sendo sugestivo do diagnóstico de legionelose um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos $\geq 1:128$, entre amostras de fase aguda e de convalescença. Devem ser pesquisadas IgG e IgM. No entanto, as técnicas serológicas apresentam reactividade cruzada entre as espécies de *Legionella* e outras bactérias, pelo que este método não é o melhor (Gouriet F, et al. 2006).

A IFA é o método *gold standard* para o diagnóstico da infecção por *C. burnetii*. Na fase aguda da febre Q, a resposta serológica é predominante é para o antígeno de fase II. Um aumento de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos entre a fase aguda e a fase de convalescença é diagnóstico, mas um título de IgM fase II $\geq 1:50$ ou um título de IgG fase II $\geq 1:200$ detectado por IFA representa uma forte evidência de infecção recente por *C. burnetii* (Gouriet F, et al. 2006).

Enzimoimunoanálise

Importantes vantagens advieram do uso de técnicas de enzimoimunoanálise (EIA/ELISA) no diagnóstico serológico das pneumonias atípicas, nomeadamente a possibilidade de automatização do processo e a necessidade de um reduzido volume de soro. São técnicas muito sensíveis para a detecção de anticorpos específicos IgG, IgM e IgA, que utilizam uma grande variedade de preparados antigénicos (proteínas e glicolípidos purificados, péptidos sintéticos, misturas de antígenos) sob diversas apresentações,

permitindo a análise simultânea de um elevado número de amostras (Andreu LM, et al. 2006). Os valores *cutoff* da densidade óptima são habitualmente definidos pelos laboratórios, com reflexo na sensibilidade e especificidade de cada técnica. As apresentações em suporte de membrana permitem a detecção qualitativa de IgM ou de IgM e IgG de uma forma fácil e rápida, em amostras únicas, com razoável sensibilidade e especificidade; porém, segundo Andreu et al. (2006), uma boa sensibilidade diagnóstica continua a só ser possível pela análise de amostras emparelhadas. Por outro lado, Zaki et al. (2009) afirma que quando o momento da amostragem é correctamente gerido, é possível utilizar eficazmente a detecção da IgM específica num teste ELISA único para o diagnóstico precoce da PAC por *M. pneumoniae*.

Num estudo prospectivo conduzido por Zaki et al. (2009) realizaram-se doseamentos séricos de IgM específicos para vários microrganismos atípicos e também alguns vírus, recorrendo a técnicas de ELISA, em 100 doentes adultos com PAC. O diagnóstico definitivo foi estabelecido recorrendo a culturas feitas com amostras de expectoração e de lavado broncoalveolar, e a testes serológicos em amostras de soro emparelhadas. Obteve-se uma sensibilidade de 60% e uma especificidade de 93.7% com o teste de ELISA para o *M. pneumoniae*, quando comparado com a cultura. Para o teste de ELISA que detectou a IgM anti-*Legionella* calculou-se uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 98.9% em relação à cultura, concluindo-se que poderia ser utilizado em doentes com PAC na impossibilidade de serem realizadas culturas. Neste estudo foi ainda possível observar que as infecções mistas têm um peso importante na etiologia das PAC, facto que reforça a necessidade de aplicação de um conjunto de testes de diagnóstico para pneumonias típicas e atípicas na abordagem inicial ao doente com PAC.

As técnicas de enzimoimunoanálise são as mais utilizadas no diagnóstico serológico da pneumonia por *M. pneumoniae*. A IgM anti-*M. pneumoniae* surge em títulos habitualmente elevados na primo-infecção em crianças e adolescentes, cerca de uma semana após o início

dos sintomas. Porém, em adultos os títulos de IgM anti-*M. pneumoniae* são muitas vezes baixos ou indetectáveis por se tratar de uma reinfeção, facto que diminui a sensibilidade dos testes de detecção única de IgM. Nestes casos a detecção da IgA, que surge na fase aguda da reinfeção, poderá ser útil (Bébéar C-M, 2008). Já Liu F. et al. (2008) sugere a combinação com uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos para um diagnóstico mais preciso.

Num estudo elaborado por Ozaki et al. (2007) procurou-se determinar a utilidade de um *kit* de diagnóstico rápido para a pneumonia por *M. pneumoniae* em crianças. O método testado foi o *kit* ImmunoCard *Mycoplasma*, uma técnica de EIA qualitativa em suporte de membrana que detecta anticorpos IgM anti-*M. pneumoniae* em 10 minutos e está disponível comercialmente. Foram recolhidas amostras de soro e do tracto respiratório das 149 crianças com diagnóstico clínico e radiológico de PAC que participaram neste estudo prospectivo. Para além da técnica de EIA, foram feitas culturas e testes CF em amostras de soro obtidas à entrada no hospital e na fase de convalescença, que estabeleceram o diagnóstico de pneumonia por *M. pneumoniae* em 45 casos (23,2%), por isolamento do microrganismo, seroconversão ou um aumento ≥ 4 vezes dos títulos de anticorpos. O ImmunoCard apresentou uma sensibilidade de 31,8% na primeira amostragem, que subiu para 88,6% com a utilização das amostras emparelhadas. Quanto à especificidade, esta foi de 78,1% para as amostras da entrada, e de 70,5% com as duas amostras. Concluiu-se que o *kit* ImmunoCard *Mycoplasma* não é eficaz no rápido diagnóstico da pneumonia por *M. pneumoniae* em crianças.

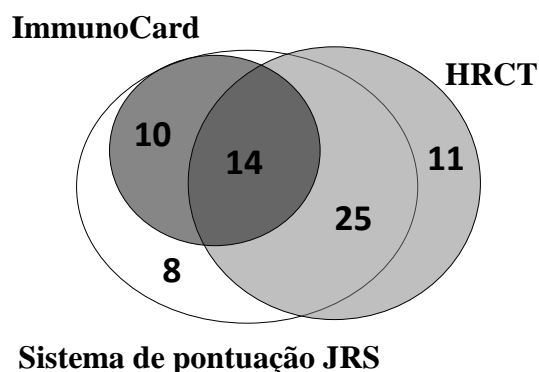
Cimolai N. (2008) descreveu a realização de um estudo em que se avaliou a eficácia do ImmunoCard *Mycoplasma* como técnica de diagnóstico rápido, comparando-o a uma técnica de *immunoblotting* para detecção da IgM anti-P1 do *M. pneumoniae* previamente validada na literatura. Das 49 amostras de soro de doentes sintomáticos testadas, 19 foram positivas pela técnica de *immunoblotting*. A sensibilidade e a especificidade do ImmunoCard foram calculadas em 73,7% e 90%, respectivamente. Três casos negativos para a técnica de

immunoblotting foram positivos com o ImmunoCard, mas estes resultados são consistentes com uma percentagem previamente calculada de 7,4% de testes positivos em doentes não infectados, com esta técnica, e com percentagens semelhantes calculadas para testes de diagnóstico similares. Considerou-se que estes testes positivos poderiam ser atribuídos à elevada seroprevalência de *M. pneumoniae* na comunidade; porém, a técnica de *immunoblotting* apresentou uma reactividade para IgM muito menor.

Um estudo posterior, realizado por Miyashita et al. (2011), avaliou novamente a exactidão e a utilidade do *kit* ImmunoCard *Mycoplasma* comparando-o com dois outros métodos de diagnóstico rápidos, a tomografia computadorizada torácica de alta resolução (HRCT) e o sistema de pontuação da *Japanese Respiratory Society* (JRS), no estabelecimento precoce de um diagnóstico presuntivo de pneumonia por *M. pneumoniae*. O sistema de pontuação da JRS avaliou 6 parâmetros clínicos e laboratoriais: idade inferior a 60 anos, presença de comorbilidade *minor* ou ausência de comorbilidades, tosse persistente, sinais auscultatórios do tórax pobres, ausência de um agente etiológico identificado por coloração Gram ou por antigénios urinários e contagem de leucócitos inferior a $10.000/\text{mm}^3$ no sangue periférico. Os três testes rápidos foram executados paralelamente em doentes com PAC por *M. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Legionella* spp., divididos pelos quatro grupos etiológicos após o estabelecimento de um diagnóstico definitivo com recurso a culturas, serologias e testes de detecção de antigénios. Entre 68 doentes com diagnóstico definitivo de pneumonia por *M. pneumoniae*, todos revelaram positividade em pelo menos um dos testes rápidos. O ImmunoCard apresentou uma sensibilidade e uma especificidade de 35% e 68%, respectivamente, com uma performance muito inferior à do sistema de pontuação da JRS (sensibilidade 83%, especificidade 90%) e à da HRCT (sensibilidade 73%, especificidade 85%). Todos os casos positivos com o ImmunoCard o foram também com o sistema de pontuação da JRS (figura 2). Verificou-se ainda que nenhum

doente nos primeiros quatro dias após o início dos sintomas apresentou testes ImmunoCard positivos. Os autores concluíram que este *kit* não é um bom método de diagnóstico rápido da pneumonia por *M. pneumoniae* em adultos, ao contrário do sistema de pontuação da JRS que revelou ser uma ferramenta útil para a decisão do início da toma de um antibiótico adequado.

Figura 2 - Representação esquemática dos resultados positivos obtidos com três testes rápidos de diagnóstico de pneumonia por *M. pneumoniae*: ImmunoCard (cinzento escuro), sistema de pontuação da JRS (branco) e HRCT (cinzento claro).



Origem: Miyashita et al. (2011) Clinical potential of diagnostic methods for the rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30:439-446 (adaptado).

Um *kit* de diagnóstico para a infecção por *C. pneumoniae* baseado numa técnica de ELISA, o Hitazyme *C. pneumoniae* Ab-IgM, foi testado por Kishimoto et al. (2009) com um novo absorvente (anticorpos IgG anti-humano), em substituição da solução de látex habitualmente utilizada, pretendendo-se desta forma reduzir a frequência de reacções não-específicas. Procurou-se também redefinir o valor *cutoff* da IgM que serve de critério de diagnóstico neste teste. Verificou-se efectivamente uma redução das reacções não-específicas pela presença do factor reumatóide e de anticorpos anti-nucleares nas amostras de soro testadas e concluiu-se que o valor *cutoff* corrigido, de 1.10 em crianças e de 1.60 em adultos para 2.00 em ambos os grupos etários, melhoraria a especificidade do teste Hitazyme IgM.

Técnicas serológicas múltiplas

As técnicas serológicas de detecção simultânea permitem a análise dos títulos de anticorpos produzidos contra vários microrganismos atípicos na mesma amostra, conseguindo desta forma uma economização de tempo e de recursos.

O desenvolvimento de *microarrays* antigénicos para a determinação específica dos agentes etiológicos das pneumonias atípicas, à semelhança do que já é feito para a detecção simultânea de anticorpos contra o *Toxoplasma gondii*, o vírus da rubéola, o citomegalovírus e os vírus herpes simplex tipos 1 e 2, permitiria uma rápida avaliação serológica do doente com PAC e traria mais confiança na instituição do regime terapêutico apropriado (Gouriet F, et al. 2008). Nesse sentido, foi desenvolvida pela InoDiag uma técnica IFA automatizada que utiliza *microarrays* antigénicos de 11 microrganismos implicados nas pneumonias atípicas: *Coxiella burnetii*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, serotipos 1 a 6 da *L. pneumophila* e *F. tularensis*. Esta técnica foi testada por Gouriet et al. (2008), recorrendo às técnicas IFA e ELISA habitualmente utilizadas no seu laboratório como referência. Foram testadas 248 amostras de soro únicas de doentes com pneumonia atípica de etiologia previamente determinada. O teste IFA automatizado da InoDiag necessitou apenas de 5 µl de soro e demorou 76 minutos por amostra. A análise sistemática da presença do factor reumatóide e de anticorpos antinucleares em cada amostra facilitou a interpretação dos resultados falsos positivos. Para a detecção da IgM da *Coxiella burnetii*, este teste apresentou uma especificidade e uma sensibilidade de 100%. Para a detecção da IgM do *M. pneumoniae* em doentes até aos 30 anos de idade, a sensibilidade foi de 100% e a especificidade foi de 98%, apresentando piores resultados em doentes com idade ≥ 30 anos. A detecção da IgG da *C. pneumoniae* e da *C. psittaci* apresentou uma sensibilidade de 81% e uma especificidade de 94%. Para a IgG da *L. pneumophila* a sensibilidade e a especificidade foram de 63% e 98%,

respectivamente. Quanto à detecção da IgG e da IgM da *F. tularensis*, a sensibilidade foi de 100% para as duas imunoglobulinas e a especificidade foi de 95% e 100%, respectivamente. Observou-se uma correlação significativa entre o teste da InoDiag e as técnicas de referência para detecção da *Coxiella burnetii*, do *M. pneumoniae* (com idade limite de 30 anos estabelecida) e da *F. tularensis*. Concluiu-se que esta técnica é eficiente no rastreio primário das infecções agudas por *Coxiella burnetii* e *F. tularensis*, onde normalmente se recorre à serologia pela dificuldade em cultivar e manipular estas bactérias. A automatização desta técnica permitiu minimizar os efeitos da subjectividade e da variabilidade inter-humana inerentes às técnicas IFA convencionais e abriu caminho para a sua padronização.

Comparação entre técnicas serológicas

Considerando que a serologia é ainda o método mais utilizado no diagnóstico microbiológico das pneumonias atípicas em todo o mundo, alguns investigadores focaram os seus estudos na avaliação comparativa da performance das diferentes técnicas serológicas disponíveis.

Com o propósito de avaliar a resposta serológica à infecção por *M. pneumoniae*, analisando a relação existente entre a produção de anticorpos anti-*M. pneumoniae* e o tempo decorrido desde o início dos sintomas, Liu F. e o seus colaboradores conceberam um estudo englobando 589 crianças com sintomas de infecção respiratória. As duas técnicas serológicas testadas foram a PA e a ELISA. Verificou-se uma superioridade da técnica de ELISA (sensibilidade 77,3%, especificidade 40%) relativamente à PA (sensibilidade 9,5%, especificidade 80%) para o diagnóstico da infecção respiratória aguda por *M. pneumoniae* em crianças. Observou-se uma relação linear entre o número de dias decorridos desde o início dos sintomas e a elevação dos níveis de IgM específica detectados por ELISA. De igual modo, os títulos de anticorpos determinados por PA aumentaram com a duração da infecção. Os níveis

de anticorpos foram significativamente mais elevados para os doentes com sintomas há 7 ou mais dias, proporcionando um aumento da sensibilidade dos testes (Liu F, et al. 2008).

Um outro estudo, desenvolvido por Beersma et al. (2005), comparou 12 testes serológicos (para detecção de IgG e IgM) disponíveis comercialmente e um teste de fixação do complemento (CF) quanto à sua performance no diagnóstico da infecção por *M. pneumoniae*, recorrendo a uma técnica de RT-PCR como *gold standard*. Os testes comercializados avaliados foram: Platelia EIA, SeroMP EIA, Serion classic EIA, Biotest EIA, Ridascreen EIA, AniLabsystems EIA, Novum EIA, Diagnosys EIA, Genzyme/Virotech EIA, ImmunoWell EIA, ImmunoCard EIA e o teste de microaglutinação de partículas Serodia-MycoII. Foram testadas amostras de 27 doentes com diagnóstico de infecção do tracto respiratório inferior por *M. pneumoniae* confirmado por PCR; testaram-se também amostras de doentes com infecções provocadas por outros agentes bacterianos e virais, inseridos em grupos de controlo. Os testes ImmunoCard IgM e Novum apresentaram pouca especificidade. Por outro lado, os testes com melhor desempenho foram o AniLabsystems EIA (sensibilidade 77%, especificidade 92%), o SeroMP EIA (sensibilidade 71%, especificidade 88%) e o teste de CF (sensibilidade 65%, especificidade 97%). Deste estudo concluiu-se que poucos testes serológicos comercializados para a detecção de *M. pneumoniae* apresentam uma performance adequada em termos de sensibilidade e especificidade.

Limitações das técnicas serológicas

Os principais problemas atribuídos ao diagnóstico serológico das pneumonias atípicas estão habitualmente relacionados com a elevada seroprevalência para microrganismos como o *M. pneumoniae* e a *C. pneumoniae*, e com o facto de a maior parte das técnicas serológicas permitir apenas um diagnóstico retrospectivo, recorrendo a amostras emparelhadas.

Muitos dos resultados falsos positivos são obtidos devido à falta de especificidade dos testes serológicos, que em alguns casos está relacionada com a presença do factor reumatóide e de anticorpos anti-nucleares na amostra (Kishimoto T, et al. 2009). Zaki et al. (2009) sugeriu que a percentagem anormalmente elevada de testes de ELISA positivos para IgM anti-*C. pneumoniae* obtida no seu estudo poderia dever-se à ocorrência de reacções cruzadas com anticorpos anti-*C. trachomatis*. No caso das infecções por *M. pneumoniae*, as técnicas serológicas convencionais como a IFA, a CF e a PA baseiam-se em antigénios obtidos de extractos de culturas que contêm glicolípidos, os quais fazem reacções cruzadas com outras espécies de *Mycoplasma* ou com bactérias gram-negativas. O desenvolvimento de técnicas de EIA que recorrem a glicolípidos obtidos a partir de lisados bacterianos, a extractos de proteínas sem antigénios glicolípidos e a enriquecimentos com adesina P1 ou péptidos sintéticos veio tentar contornar esse problema (Beersma MFC, et al. 2005).

Por outro lado, nas técnicas de aglutinação e de enzimoimunoanálise a presença de grandes quantidades de anticorpos pode provocar uma quebra de sinal e o resultado será um falso negativo (Gouriet F, et al. 2006). Um atraso na produção de anticorpos, um comprometimento da resposta imunitária humoral ou uma colheita de soro após o início da antibioterapia podem também resultar em testes falsamente negativos (Waites KB, et al. 2008).

6.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO

6.2.1 CULTURA

A cultura dos patógenos atípicos é um método de diagnóstico altamente específico, porém reveste-se de particular complexidade. Estes microrganismos apresentam um crescimento fastidioso, exigente e demorado, pelo que esta técnica tem sido progressivamente substituída por outras técnicas de identificação directa, como a PCR, no diagnóstico da pneumonia por *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae*.

No caso particular do *M. pneumoniae*, a reduzida dimensão do seu genoma, que condiciona limitações na sua capacidade biossintética, faz com que seja difícil a sua cultura *in vitro* e haja necessidade de suplementação complexa do meio (Atkinson TP, et al. 2008). Por outro lado, a técnica é relativamente pouco sensível, apresentando um limite mínimo de detecção de 10^5 CFU/ml (Andreu LM, et al. 2006). A identificação da espécie faz-se analisando as propriedades metabólicas e o aspecto das colónias (Bébéar C-M, 2008).

Apesar das dificuldades inerentes ao método, a cultura é ainda o método *gold standard* para o diagnóstico da infecção por *Legionella* spp. (Gouriet F, et al. 2006). A técnica requer um meio de cultura próprio, habitualmente com extractos de leveduras, e utiliza amostras de expectoração ou outras secreções respiratórias (Cunha BA, 2006). Após vários dias de incubação, aparecem colónias que têm de ser identificadas, nomeadamente por coloração Gram ou imunofluorescência indirecta (Zaki MES, et al. 2009).

A cultura dos agentes zoonóticos é raramente efectuada com propósitos diagnósticos, não só devido à dificuldade do isolamento mas sobretudo devido ao risco biológico, já que a *F. tularensis* e a *C. burnetii* são altamente infecciosas e perigosas (Cunha BA, 2006).

6.2.2 TÉCNICAS DE DETECÇÃO DIRECTA DE ANTIGÉNIOS

A detecção de antígenos dos microrganismos atípicos permite um diagnóstico rápido e sem exigências rigorosas em termos de transporte da amostra. Alguns métodos referidos para a detecção de anticorpos são também aqui utilizados, como a enzimoimunoanálise e a imunofluorescência. Estas técnicas carecem de sensibilidade e especificidade, pelo que não são habitualmente utilizadas no diagnóstico microbiológico das pneumonias atípicas, com excepção da detecção do antígeno urinário da *L. pneumophila* do serogrupo 1.

A detecção de antígenos do serogrupo 1 da *L. pneumophila* na urina é recomendada para o diagnóstico da infecção por *Legionella* em casos de PAC severa ou suspeita clínica. Trata-se de um teste rápido, barato, altamente sensível e específico (Gouriet F, et al. 2006). Porém, um teste de detecção de antígenos na urina negativo não exclui o diagnóstico de legionelose por outros serogrupos de *Legionella* (Gouriet F, et al. 2008). Apesar de a *L. pneumophila* do serogrupo 1 ser a mais frequente entre as várias espécies de *Legionella*, a limitação deste teste de detecção de antígenos a apenas uma espécie constitui uma importante desvantagem. A antigenúria leva vários dias a desenvolver-se após o início da doença, pelo que a execução precoce do teste de detecção de antígenos poderá resultar num falso negativo. O teste será positivo durante várias semanas ou mesmo meses, até muito depois da resolução clínica da infecção (Cunha BA, 2006).

6.2.3 TÉCNICAS DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PCR

Desde que o primeiro método de amplificação dos ácidos nucleicos - a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - foi desenvolvido em finais dos anos 1980, centenas de estudos foram publicados sobre a sua aplicação na detecção de microrganismos atípicos em indivíduos com pneumonia. A sua sensibilidade é muito alta, conseguindo revelar a presença de bactérias em número reduzido quando são utilizadas amostras de ADN purificado. Tem ainda outras vantagens como o completar do procedimento em menos de um dia, a obtenção precoce de resultados positivos após o início da doença, a identificação de organismos não viáveis e a detecção de ácidos nucleicos em tecidos preservados (Waites KB, et al. 2008).

Outras técnicas baseadas na PCR têm surgido, procurando vantagens relativamente à técnica convencional: a *real-time* PCR (RT-PCR), a *nested* PCR, a *reverse transcriptase* PCR e a *multiplex* PCR são alguns exemplos. A técnica de RT-PCR, por exemplo, é mais rápida, prática e com menor risco de contaminação que a técnica convencional devido à redução do manuseamento (Waites KB, et al. 2008), para além de permitir a monitorização dos resultados em tempo real.

Na Europa já existem alguns testes de PCR para detecção de microrganismos atípicos em comercialização, porém alguns laboratórios continuaram a desenvolver e a testar as suas próprias técnicas. Pitcher et al. (2006) desenvolveu uma técnica de RT-PCR que amplifica uma região do gene da adesina P1 do *M. pneumoniae*, utilizando um mecanismo de controlo interno para detectar falsos negativos devido a inibição. Foi calculada uma detecção mínima de 1×10^3 organismos por mililitro. A técnica foi aplicada retrospectivamente em 175 amostras do tracto respiratório, colhidas de doentes com pneumonia, e os resultados foram

avaliados tendo como referência testes serológicos, revelando 60% de sensibilidade e 96.7% de especificidade. Foi ainda detectada inibição em 24% das amostras não diluídas, observando-se uma redução para 4% em amostras com uma diluição de 1/10. Os autores concluíram que esta técnica, capaz de analisar até 27 amostras em menos de uma hora, seria apropriada para o diagnóstico de infecções por *M. pneumoniae* na prática clínica do dia-a-dia.

Um outro teste de RT-PCR para a detecção de *M. pneumoniae* foi concebido e avaliado por Morozumi et al. (2006) utilizando amostras clínicas de crianças com PAC. A sensibilidade analítica da técnica foi calculada em 10 CFU por tubo de reacção. Os resultados foram obtidos em 2 horas, com sensibilidade e especificidade diagnósticas de 99.2% e 97.5%, respectivamente. Concluiu-se que este teste satisfaz a necessidade de uma identificação rápida, altamente sensível e específica do *M. pneumoniae* na população infantil com PAC.

NASBA

Posteriormente ao surgimento da PCR, foi desenvolvido um outro método de amplificação molecular no início dos anos 1990, a NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*). Enquanto que a PCR convencional amplifica ADN, a NASBA amplifica o ARN ribossomal da bactéria que se encontra presente em múltiplas cópias. A amplificação de ARN também é possível através da *reverse transcriptase* PCR, porém a NASBA tem a vantagem de ser realizada em condições isotérmicas. A aplicação da técnica em tempo real, a RT-NASBA, tem as mesmas vantagens da RT-PCR relativamente à PCR convencional, entre elas a rapidez na obtenção de resultados e a redução na manipulação das amostras (Loens K, et al. 2008).

LAMP

Recentemente, um novo método de amplificação de ácidos nucleicos foi desenvolvido, a LAMP (“Loop-mediated Isothermal Amplification”), cuja aplicação no diagnóstico de pneumonias atípicas provocadas pelo *M. pneumoniae* foi pela primeira vez relatada na literatura por Saito et al. (2005). Tal como a NASBA, este é um método de amplificação isotérmico que necessita apenas de uma temperatura estável entre 63°C e 65°C, dispensando a utilização de um termociclador como acontece na PCR, e que pode também ser monitorizado em tempo real. A técnica foi aplicada em 95 amostras colhidas por zaragatoa da nasofaringe de doentes e de indivíduos saudáveis e comparada com uma técnica de RT-PCR não comercializada, verificando-se concordância total entre resultados. Observou-se uma detecção mínima de 2×10^2 organismos numa reacção de 60 minutos com a LAMP e de 2×10^1 organismos nas mesmas condições com a RT-PCR, o que indica sensibilidades muito próximas entre as duas técnicas. No entanto, a LAMP é um método mais simples e com menos custos que a PCR, pelo que poderá ser uma opção mais viável que a PCR na prática clínica (Saito R, et al. 2005).

Genes, regiões intergénicas e sequências de ARN alvo

As técnicas de amplificação molecular têm usado sequências de ADN, como secções de genes e regiões intergénicas, e sequências de ARN específicas dos microrganismos atípicos como alvo para a amplificação. A escolha de uma determinada sequência de ácidos nucleicos terá influência na performance do teste, sobretudo se esta não for suficientemente específica. Na tabela I estão listados os alvos da amplificação que foram utilizados ou referidos nos artigos revistos neste trabalho.

Tabela I – Alvos das técnicas de amplificação molecular.

Microrganismos atípicos	Genes, regiões intergénicas e sequências de ARN
<i>M. pneumoniae</i>	16S rARN; adesina P1; ATPase; tuf; repMp1; toxina do CARDS
<i>C. pneumoniae</i>	16S rARN; Pmp4; ompA; PstI; omp2
<i>Legionella spp.</i>	16S rARN; Mip; dnaJ
<i>C. burnetii</i>	COM-I

Tipo de amostra

A escolha do melhor tipo de amostra e uma colheita minuciosa são requisitos fundamentais para se obter a melhor performance por parte das técnicas de amplificação. A utilização de um determinado tipo de amostra pode ter impacto nos resultados, nomeadamente devido à presença de inibidores da PCR, à quantidade de patógenos recolhidos ou ao grau de contaminação por outros agentes. Foi realizado um estudo durante um surto de pneumonia no exército finlandês que comparou três tipos de amostras do tracto respiratório de 32 adultos jovens com serologias positivas para *M. pneumoniae*, entre eles: a expectoração, o aspirado nasofaríngeo e a zaragatoa da orofaringe. O diagrama da figura 3 mostra que a expectoração provou ser o melhor tipo de amostra, conseguindo o maior número de testes positivos, seguida do aspirado nasofaríngeo; os piores resultados foram obtidos com a zaragatoa da orofaringe. A mais provável explicação para este facto consiste na presença de um maior número de microrganismos no tracto respiratório inferior, de onde provém a expectoração, em doentes com pneumonia (Räty R, et al. 2005). Na prática, muitos doentes podem não produzir expectoração, pelo que as amostras da nasofaringe e da orofaringe representam muitas vezes a única alternativa (Waites KB, et al. 2008). Existem ainda outros tipos de amostras do tracto

respiratório, como o lavado broncoalveolar e a escovagem brônquica (Bébéar C-M, 2007), obtidos através de manobras invasivas que não se justificam na maior parte dos casos.

Há ainda poucos dados sobre a utilidade da aplicação das técnicas de PCR em amostras de sangue, soro ou plasma, para a identificação dos patógenos implicados nas pneumonias atípicas. O soro tem as vantagens de ser menos dependente da qualidade da colheita, da facilidade no armazenamento e manuseamento e da improbabilidade da detecção de microrganismos em indivíduos assintomáticos. Nesse sentido, num estudo realizado por Daxboeck et al. (2005) analisou-se o soro de 29 doentes com PAC por *M. pneumoniae* comprovada clinicamente e através de serologia, utilizando uma técnica de PCR convencional e uma técnica de RT-PCR. Foram obtidos resultados positivos em 52% dos doentes com a RT-PCR e nenhum resultado positivo com a técnica convencional, o que demonstra uma maior sensibilidade da primeira técnica na detecção de *M. pneumoniae* no soro. Os dados mostraram ainda que o *M. pneumoniae* está presente na corrente sanguínea de uma porção significativa de doentes com pneumonia por micoplasma. Os autores realçam, porém, o fraco valor preditivo negativo da técnica e a necessidade de estudos mais alargados para avaliar o potencial benefício clínico da aplicação da PCR em amostras de sangue e de soro.

Figura 3 - Esquema representativo do número de casos PCR positivos identificados pelos três tipos de amostras, recolhidas do tracto respiratório de 22 doentes com pneumonia por *M. pneumoniae*.



Origem: Rätty R, et al. (2005) Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. J Med Microbiol 54:287-291 (adaptado).

Técnicas de amplificação molecular múltipla

Algumas investigações mais recentes têm-se debruçado no desenvolvimento de técnicas de amplificação simultânea de ácidos nucleicos de diferentes microrganismos atípicos. De facto, a tentativa de identificação dos patógenos responsáveis por quadros clínicos tão similares num único ensaio constitui uma importante poupança em termos de tempo, reagentes e utilização dos equipamentos (Gullsby K, et al. 2008).

Gullsby et al. (2008) desenvolveu uma técnica de RT-PCR *duplex* concebida para detectar *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* num único tubo de reacção. Os genes-alvo desta técnica são o gene da adesina P1 do *M. pneumoniae* e o gene *ompA* da *C. pneumoniae*. Recorreu-se a sinalizadores moleculares marcados com diferentes fluorocromos para possibilitar a distinção entre os microrganismos. Foram testadas com esta técnica 120 amostras, obtidas por zangaratoa da nasofaringe ou da orofaringe, utilizando como referência duas técnicas de PCR convencional para a detecção individual de cada uma das espécies em estudo. Treze testes de RT-PCR *duplex* positivos para *C. pneumoniae* foram obtidos entre os 14 casos identificados por PCR convencional, calculando-se uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 93%. Quanto ao *M. pneumoniae*, 24 testes de RT-PCR *duplex* foram positivos contra apenas 22 casos detectados pela técnica convencional; os dois casos discrepantes foram analisados por uma terceira técnica de PCR e apenas um dos resultados confirmou ser positivo. A especificidade e a sensibilidade diagnósticas calculadas para o *M. pneumoniae* foram de 98% e 100% respectivamente, tomando a técnica convencional como referência. Também a sensibilidade analítica foi calculada, apresentando valores tão altos quanto os descritos para outras técnicas de RT-PCR simples, mesmo na análise de amostras de co-infecção com os dois microrganismos. Em suma, a performance desta técnica de RT-PCR *duplex* foi comparável à da PCR convencional.

O ProPneumo-I, um teste de RT-PCR *duplex* para a detecção simultânea de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* disponível comercialmente, foi avaliado num estudo por Higgins et al. (2009). Analisaram-se retrospectivamente 146 amostras do tracto respiratório com o teste ProPneumo-I, utilizando como referência uma técnica de RT-PCR para a *C. pneumoniae* e a cultura para a *M. pneumoniae*. As amostras com resultados discordantes foram reanalisadas por outro teste de PCR *multiplex* comercializado, o PneumoBacter-I. A sensibilidade do ProPneumo-I foi calculada em 100% para ambos os microrganismos testados e a especificidade foi de 100% para a *C. pneumoniae* e de 98% para o *M. pneumoniae*, após a confirmação dos resultados discordantes.

Uma outra técnica de PCR *multiplex* comercializada, a Chlamylege, desenvolvida para detectar simultaneamente os principais microrganismos implicados na pneumonia atípica – *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* e a maior parte das espécies de *Legionella* – foi avaliada num estudo elaborado por Honderlick et al. (2006). As regiões do genoma amplificadas foram o gene OMP2 da *C. pneumoniae*, o gene da adesina P1 do *M. pneumoniae* e a região intergénica entre os genes 23S e 5S ARN da *L. pneumophila* e outras espécies de *Legionella*. Participaram no estudo 43 doentes com suspeita clínica de pneumonia atípica que foram submetidos também a outros testes de diagnóstico habitualmente utilizados na clínica, como culturas, serologias e detecção de antígenos na urina. Quatro testes de PCR *multiplex* foram positivos, três dos quais para o *M. pneumoniae* e um para a *L. pneumophila* tipo 1. Em oito doentes foi detectado outro patógeno para além dos focados neste estudo e em 29 doentes não foi encontrado qualquer agente etiológico. Destes últimos, 23 tiveram uma melhoria significativa do seu estado clínico após 48 a 72h de antibioterapia empírica. Os autores concluíram que este teste de PCR *multiplex* é um método de diagnóstico rápido e fiável; porém, questionam a necessidade de se recorrer a métodos de diagnóstico microbiológico

neste tipo de doentes com pneumonia não-severa, face aos custos económicos que acarretam e à elevada percentagem de bons resultados obtidos com antibioterapia empírica.

Um *kit* da Vircell SL constituído por uma técnica de PCR *multiplex*, para a detecção simultânea de *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *L. pneumophila* e *Legionella* spp. em amostras do tracto respiratório, e *line blot* para a interpretação de resultados, foi testado por Carrillo et al. (2009). Após ter havido perda de sensibilidade nos primeiros ensaios efectuados com a técnica de PCR *multiplex*, decidiram dividir a técnica, criando uma para a detecção de *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e *Coxiella burnetii* e outra para detectar *L. pneumophila*, *Legionella* spp. e o controlo interno de amplificação. O *kit* foi testado em 54 crianças com sinais clínicos e radiológicos de pneumonia e os resultados foram interpretados utilizando culturas, serologias e detecção de antígenos como referência. Dos 14 casos de infecção por *M. pneumoniae* comprovada foram detectados 13 pela técnica de PCR *multiplex*, calculando-se uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 92.8% para este microrganismo. As duas crianças infectadas por *Coxiella burnetii* não foram identificadas pela técnica de PCR *multiplex*, mas os autores atribuem este insucesso ao facto de se encontrarem numa fase mais avançada da doença. Dos restantes 38 casos com testes de PCR *multiplex* negativos, 20 foram identificados como infecções por *Streptococcus pneumoniae* e 17 foram definidos como infecções de provável etiologia viral. Não foi possível avaliar a performance desta técnica na detecção de *Legionella* spp, *L. pneumophila* e *C. pneumoniae* em amostras clínicas, apesar de a sensibilidade analítica calculada ter sido alta. A especificidade do teste foi determinada pela análise de 55 amostras de indivíduos assintomáticos, que não obteve nenhum resultado positivo, e pela ausência de reacções cruzadas com outros microrganismos. Ao contrário de outros testes que fazem a interpretação dos resultados pela utilização de gel de agarose ou ELISA, este *kit* permite uma leitura visual

directa dos resultados recorrendo à hibridização por *line blot*, representando uma vantagem no contexto clínico.

A performance de um conjunto de técnicas de RT-PCR e RT-PCR *multiplex* concebidas para detectar microrganismos atípicos e vírus respiratórios foi avaliada num estudo prospectivo por Templeton et al. (2005). Amostras recolhidas de 105 doentes com PAC, com infiltrados visíveis na radiografia do tórax, foram testadas com as técnicas de RT-PCR, para além das técnicas convencionais (culturas e serologias). Os resultados das técnicas de PCR foram obtidos em apenas 6 horas. A utilização das RT-PCR permitiu o diagnóstico microbiológico em 76% dos doentes, mas em apenas 49,5% dos doentes se determinou a etiologia da PAC recorrendo às técnicas convencionais. Nos doentes idosos e nos doentes com pneumonia severa, foi encontrada uma etiologia em 87% e em 93% dos casos, respectivamente, recorrendo às técnicas de RT-PCR. Concluiu-se que a combinação de várias técnicas de RT-PCR simples e *multiplex* que permitam detectar os principais microrganismos atípicos e vírus respiratórios causadores de PAC é mais sensível que as técnicas convencionais e permite a obtenção de resultados num período de tempo clinicamente relevante. Esta sensibilidade particularmente aumentada em doentes idosos e com pneumonia severa sugere que este método possa ajudar na orientação terapêutica destes doentes.

Loens et al. (2008a) conceberam e testaram uma técnica de RT-NASBA *multiplex* que detecta e amplifica o 16S rARN do *M. pneumoniae*, da *C. pneumoniae* e da *Legionella* spp. na mesma análise de uma amostra do tracto respiratório. A sensibilidade analítica desta técnica revelou-se ligeiramente inferior à sensibilidade analítica das técnicas RT-NASBA individuais correspondentes. Apesar disso, segundo os autores esta é uma técnica promissora pois conjuga as vantagens da NASBA como técnica de amplificação molecular com as vantagens de uma pesquisa simultânea de vários patógenos atípicos em tempo real.

Comparação entre técnicas de amplificação molecular

Perante a crescente oferta de técnicas de amplificação molecular para patógenos atípicos, surgiu a necessidade de avaliar comparativamente a sua performance em estudos que estabeleçam as mesmas condições para os testes em avaliação.

Duas técnicas de RT-PCR utilizadas na detecção de *C. pneumoniae* foram desenvolvidas e avaliadas por Mitchell et al. (2009), utilizando para o efeito 401 amostras colhidas por zaragatoa da orofaringe de doentes com sintomas de pneumonia. Os dois genes-alvo foram o *pmp4* (técnica Pmp4) e o *ompA* (técnica MOMP). A técnica MOMP revelou maior sensibilidade, tendo obtido 5,7% de testes positivos, contra apenas 2,7% de testes positivos pela técnica Pmp4. Estas duas técnicas foram ainda utilizadas num surto de etiologia desconhecida e ambas detectaram mais 4 casos de infecção por *C. pneumoniae* para além dos 9 casos também identificados por uma técnica de PCR convencional.

Um outro estudo comparou o desempenho de três testes de RT-PCR desenhados para amplificar três regiões genómicas distintas do *M. pneumoniae*: uma região do gene da toxina do CARDS (recentemente descoberto) designada M181, e duas regiões do gene da ATPase, designadas por Mp3 e Mp7. Tratou-se de um estudo prospectivo, em que os diferentes testes foram utilizados na identificação de um surto de *M. pneumoniae* ocorrido numa escola. Foram testadas 54 amostras do tracto respiratório de 35 doentes, com pneumonia clínica e radiologicamente comprovada, e de 19 controlos negativos. Dezoito casos de pneumonia por *M. pneumoniae* foram detectados por todos, mas o teste baseado no gene da toxina do CARDS mostrou o melhor desempenho clínico e analítico, apresentando os limites de detecção mais baixos. Apesar disso, os autores sugerem que a utilização paralela de múltiplos alvos de amplificação aumentaria o nível de confiança dos resultados, nomeadamente na investigação etiológica de surtos (Winchell JM, et al. 2008).

Dumke e Jacobs (2009) avaliaram dois testes de RT-PCR comercializados e três não comercializados para a detecção de *M. pneumoniae*, sob as mesmas condições padronizadas. Os testes não comercializados escolhidos amplificaram três regiões distintas do genoma: elementos repetitivos RepMp1, uma parte do gene operão da ATPase e uma parte do gene da toxina do CARDS. Os dois testes comercializados amplificaram uma parte do gene da adesina P1 (Venor Mp-QP) e os elementos repetitivos RepMp1 (Artus *M. pneumoniae* LC PCR kit). Os resultados mostraram diferenças significativas nas sensibilidades dos cinco testes avaliados, especialmente entre os testes que amplificaram os elementos repetitivos RepMp1 e os outros testes, sendo que os primeiros apresentaram maior sensibilidade. Porém, todos conseguiram detectar os diferentes génotipos conhecidos de *M. pneumoniae* com uma sensibilidade analítica de pelo menos 1 CFU/μl, pelo que são recomendados para o diagnóstico em laboratório.

A combinação entre um sistema de extracção de ácidos nucleicos e uma técnica RT-NASBA recentemente desenvolvidos e comercializados por um laboratório foi comparada com uma combinação entre um sistema de extracção comercializado por outro laboratório e uma técnica de RT-PCR não comercializada desenvolvida por Bèssède et al. (2010). As respectivas performances na detecção de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* foram avaliadas retrospectivamente em 78 amostras do tracto respiratório de casos e não-casos. Os genes amplificados pelas técnicas de RT-PCR foram o *pmp4* para a *C. pneumoniae* e o gene da adesina P1 para o *M. pneumoniae*. Foram calculadas especificidades analíticas semelhantes entre as duas combinações. Porém, uma diferença significativa foi encontrada nos limites de detecção da *C. pneumoniae* das duas combinações, sendo que a combinação comercializada detectou ácidos nucleicos em amostras 10⁶ vezes mais diluídas. Esta diferença, que não se verificou com o *M. pneumoniae*, poderá ser explicada pelos diferentes genes amplificados. Não foi possível comprovar se esta maior sensibilidade analítica correspondia a uma maior

sensibilidade clínica já que apenas uma amostra foi positiva para a *C. pneumoniae* com as duas técnicas. Quanto ao *M. pneumoniae*, as sensibilidades clínicas calculadas foram equivalentes (Béssède E, et al. 2010).

A sensibilidade e a especificidade de diferentes técnicas de amplificação de ácidos nucleicos - entre elas, uma PCR convencional, uma RT-PCR, uma RT-NASBA simples e uma RT-NASBA *multiplex* testada por Loens et al. (2008a) - para a detecção de *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e *Legionella spp.* em amostras do tracto respiratório de doentes com PAC, foram comparadas num estudo realizado por Loens et al. (2008b). Foram testadas 251 amostras de 147 doentes com sinais radiológicos de pneumonia. Os resultados obtidos com estas técnicas foram avaliados tendo em consideração resultados de serologias, culturas e testes de antigénios urinários (para a *Legionella*) também disponíveis. A RT-NASBA simples demonstrou maior sensibilidade que a PCR e a RT-NASBA *multiplex*. O maior sucesso da NASBA poderá ser explicado pelo facto de ampliar rARN, habitualmente presente em múltiplas cópias, enquanto a PCR pode não detectar ADN presente em menor quantidade em algumas amostras. Por outro lado, uma das técnicas de PCR foi concebida para detectar especificamente *L. pneumophila*, ao contrário das técnicas de NASBA que detectaram ARN de diferentes espécies de *Legionella*. Verificou-se ainda que a instabilidade do ARN pode representar um problema na futura utilização de técnicas NASBA para o diagnóstico microbiológico das pneumonias atípicas, pelo que devem ser tomadas precauções na recolha, armazenamento e transporte das amostras (Loens K, et al. 2008b).

Limitações das técnicas de amplificação molecular

As técnicas moleculares demonstram, na maioria dos estudos, uma sensibilidade superior para o diagnóstico de infecções agudas por agentes atípicos, quando comparadas com outras técnicas como a cultura ou a serologia. Porém, alguns estudos revelaram as suas

limitações. Um teste de PCR positivo e uma cultura negativa num indivíduo sem evidência clínica de doença respiratória é sugestivo de falta de especificidade da técnica de PCR escolhida ou de portação assintomática/persistência do microrganismo, porventura no compartimento intracelular. Outro teste PCR positivo num indivíduo sintomático com testes serológicos negativos pode corresponder a uma colheita precoce do soro (antes do desenvolvimento da resposta imunitária humoral), a uma resposta do sistema imunitário fraca ou ausente e/ou a antibioterapia precoce e eficaz. Por outro lado, um teste PCR negativo com uma serologia positiva sugere a presença de inibidores ou a existência de problemas com a técnica em si ou com o gene-alvo, pelo que a realização de outro teste de PCR amplificando um gene diferente será útil no último caso (Waites KB, et al. 2008).

6.3 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO E INDIRECTO

Outro ponto crítico da investigação no campo do diagnóstico microbiológico das pneumonias atípicas é a realização de estudos que avaliam simultaneamente a performance de técnicas directas e indirectas. A maior parte dos estudos comparam técnicas serológicas com técnicas de PCR, perspectivando a substituição dos métodos tradicionais por métodos mais modernos ou uma utilização conjunta, para maior acuidade diagnóstica.

Em Taiwan foi realizado um estudo prospectivo com 256 crianças hospitalizadas por infecções do tracto respiratório, das quais 143 tinham manifestações clínicas de pneumonia, cujo objectivo foi avaliar a utilidade da PCR no diagnóstico precoce da infecção por *M. pneumoniae*, tendo em vista a agilização do tratamento apropriado. Realizaram-se testes de PCR em todos os doentes e serologias (por microaglutinação de partículas e ELISA) em 140 doentes com suspeita clínica de pneumonia atípica. Verificou-se que em 72 das 82 crianças com testes PCR positivos as amostras foram colhidas menos de 7 dias após o início da doença, enquanto apenas 12 das 76 crianças com serologias positivas obtiveram resultados positivos nesses primeiros dias. Apesar das discrepâncias entre serologia e PCR observadas em 38 doentes, foi possível concluir que a PCR possibilita uma detecção rápida e precoce do *M. pneumoniae* na fase aguda. Compararam-se ainda os resultados de dois testes de PCR realizados em 7 crianças, antes e após antibioterapia com macrólidos: o segundo teste foi positivo para 3 crianças sob tratamento há 1-4 dias, mas tornou-se negativo para 4 crianças cuja segunda amostra foi colhida mais de 7 dias após o início do tratamento. Estes resultados vão de encontro aos de estudos anteriores e sugerem que a colheita de amostras para testes de PCR deve ser feita antes do início da antibioterapia (Liu F, et al. 2007).

Um outro estudo realizado durante um surto comunitário de infecção por *M. pneumoniae* na Suécia provou também a superioridade da PCR relativamente à serologia no que respeita ao diagnóstico precoce desta infecção numa população maioritariamente adulta (Nilsson AC, et al. 2008). Durante as duas primeiras semanas após o início dos sintomas, foi possível detectar 96-100% dos casos através da PCR (utilizando quer a *semi-nested* PCR quer a RT-PCR quantitativa) e apenas 23-56% dos casos por serologia (ELISA). A sensibilidade da PCR foi diminuindo nas fases mais tardias de doença. Porém, no seguimento que foi feito aos doentes com testes de PCR inicialmente positivos, cerca de metade ainda apresentava ADN detectável 7 semanas após o início dos sintomas. Nos meses seguintes, houve uma diminuição progressiva da carga bacteriana nos restantes indivíduos que, invariavelmente, vieram a obter testes de PCR negativos, tendo sido de 7 meses a persistência máxima. Este padrão mostra que não há uma transição da infecção clinicamente activa para a colonização crónica, mas explica também a possibilidade de ocorrência de testes PCR positivos em indivíduos assintomáticos que tiveram uma infecção mais ou menos recente. A quantificação por RT-PCR não mostrou diferenças significativas na depuração bacteriana entre indivíduos tratados e não tratados com antibióticos activos contra o *M. pneumoniae*, resultado que é contrário ao do estudo referido anteriormente. Por fim, a ausência de testes de PCR positivos em 236 crianças assintomáticas de uma escola da mesma comunidade demonstrou que é raro o estado de portador assintomático, mesmo durante um surto.

As amostras recolhidas durante dois surtos de pneumonia por *M. pneumoniae* foram analisadas por Thurman et al. (2009) recorrendo a dois *kits* de testes serológicos comercializados (ImmunoCard *Mycoplasma* e *Mycoplasma pneumoniae* IgG/IgM Antibody Test System) e a uma técnica de RT-PCR. Zaragoas da orofaringe e da nasofaringe e amostras de soro foram obtidas de doentes sintomáticos, dos seus contactos domésticos e de indivíduos assintomáticos. Entre os doentes, 21% tiveram testes de RT-PCR positivos,

enquanto 81% e 54% tiveram resultados positivos com o ImmunoCard e o Antibody Test System, respectivamente. Entre os contactos domésticos e os indivíduos assintomáticos, 1,8% foram positivos pela RT-PCR, enquanto 63% e 79% foram positivos pelo ImmunoCard e pelo Antibody Test System, respectivamente. A sensibilidade e a especificidade das três técnicas apresentaram uma ampla variedade de valores, tendo sido afectadas pela idade dos indivíduos e pela fase da doença em que as amostras foram recolhidas. Concluiu-se que não existe uma técnica disponível que isoladamente possa ser utilizada de forma eficaz na identificação de um surto de PAC por *M. pneumoniae*, mas que uma combinação de métodos de diagnóstico parece ser a abordagem mais apropriada.

Dois artigos avaliaram a serologia e a RT-PCR na detecção da *C. pneumoniae* e do *M. pneumoniae*. No estudo elaborado por Otomo et al. (2008) foram incluídas 73 crianças com suspeita de pneumonia ou infecção do tracto respiratório inferior atípicas. As amostras recolhidas foram testadas para a infecção por *C. pneumoniae* recorrendo a uma técnica de RT-PCR e a dois kits ELISA comercializados para a detecção de anticorpos IgG e IgA (Hitazyme *C. pneumoniae* Ab-IgG e Hitazyme *C. pneumoniae* Ab-IgA). Para o diagnóstico da infecção por *M. pneumoniae* foi utilizada a RT-PCR, uma técnica de PA comercializada (Serodia-Myc II) e uma técnica de EIA comercializada (ImmunoCard *Mycoplasma*). Relativamente às técnicas de RT-PCR, determinaram-se sensibilidades analíticas de 1 e 5 cópias/ μ l para a *C. pneumoniae* e o *M. pneumoniae*, respectivamente; as sensibilidades e as especificidades diagnósticas foram de 63.6% e 100% para a *C. pneumoniae* e de 100% para o *M. pneumoniae*, respectivamente. Quanto aos testes de ELISA para anticorpos anti-*C. pneumoniae*, destes resultaram 11 casos positivos, dos quais 7 o foram também pela RT-PCR; entre os 4 casos discordantes encontravam-se uma infecção mista, dois doentes com antibioterapia anterior e um doente com sintomas e sinais radiográficos ligeiros. A PA para *M. pneumoniae* detectou 6 casos que foram positivos também pelo teste de RT-PCR; porém, 4 casos com testes RT-PCR

negativos e com títulos de anticorpos elevados foram interpretados como infecções passadas. Quanto ao ImmunoCard, apresentou uma sensibilidade de 33.3% e uma especificidade de 82.1%, valores que são sobreponíveis aos já apresentados nesta revisão para este teste. Assim, as técnicas de RT-PCR provaram ser indicadas para o rápido diagnóstico destas infecções, permitindo a escolha apropriada da terapêutica antibacteriana de primeira linha a ser instituída. O outro estudo, da autoria de Pignanelli et al. (2009), avaliou a eficácia dos dois métodos em doentes adultos com sintomas respiratórios agudos. Utilizaram-se técnicas comercializadas de RT-PCR, para detecção individual (LightCycler) e para detecção simultânea dos dois microrganismos atípicos (Affigene Cp/Mp Tracer). A microimunofluorescência (para IgG e IgM anti-*C. pneumoniae*) e dois testes ELISA comercializados (Novagnost *M. pneumoniae* IgG e IgM Dade Behring Siemens para *M. pneumoniae*) foram as técnicas serológicas escolhidas. Os resultados obtidos com as técnicas de RT-PCR apresentaram elevada concordância entre si (100% para *C. pneumoniae* e 98% para *M. pneumoniae*) e também com os resultados dos testes serológicos, recomendando-se a utilização simultânea de um teste directo e de um teste indirecto para maior acuidade no diagnóstico etiológico de infecções respiratórias atípicas.

Em Nova Deli (Índia), comparou-se a eficácia da cultura, da PCR e da serologia no diagnóstico de infecções do tracto respiratório inferior provocadas por *M. pneumoniae*, na população pediátrica. Foram colhidas amostras de soro e aspirados nasofaríngeos de 75 crianças com idades compreendidas entre os 6 meses e os 12 anos. A cultura do aspirado foi feita em meio sólido padrão para micoplasmas e as colónias suspeitas foram identificadas com recurso a testes bioquímicos e biológicos. A técnica de PCR utilizada amplificou uma secção do gene da adesina P1, detectada posteriormente por electroforese. As amostras de soro, colhidas na fase aguda e na fase de convalescência (4 a 6 semanas depois), foram testadas para a presença de anticorpos IgG e IgM contra *M. pneumoniae* utilizando técnicas de EIA

comercializadas. Apenas 4 casos de infecção por *M. pneumoniae* apresentaram culturas positivas, tendo sido identificados também por PCR e serologia. A EIA detectou 16 casos (21.3%) enquanto que a PCR detectou apenas 13 (17.3%), dos quais 11 foram positivos também por serologia. Não foi possível determinar se os dois casos positivos apenas por PCR representavam falsos positivos, se correspondiam a um estado de portador ou se tratavam de resultados serológicos falsamente negativos. No total, utilizando os três métodos, foi possível identificar o *M. pneumoniae* em 24% das crianças, pelo que deste estudo se concluiu que uma combinação de cultura, serologia e PCR providencia a melhor informação etiológica na infecção do tracto respiratório inferior causada por este agente, numa população pediátrica (Kashyap B, et al. 2008).

Um estudo mais abrangente, elaborado por Souliou et al. (2007), avaliou praticamente todos os métodos laboratoriais actualmente utilizados no diagnóstico da infecção por *M. pneumoniae* – cultura, detecção antigénica (por EIA), PCR e serologia (por IFA, ELISA e *capture*-ELISA) – utilizando zaragatoas da orofaringe e amostras de soro pareadas de crianças hospitalizadas por infecção do tracto respiratório, nomeadamente pneumonia. Recorreu-se a uma técnica de *Western Blot* para verificar a especificidade dos testes de detecção de anticorpos IgM e IgA. A sensibilidade diagnóstica da PCR (75%) foi muito superior à da detecção de antígenos (8.3%) e à da cultura (25%), mas falhou na detecção de 25% dos casos. Quanto à especificidade, a cultura e a detecção de antígenos obtiveram 100% e a PCR 96.8%. No que respeita aos métodos serológicos, a *capture*-ELISA para a detecção de IgM mostrou ser a mais sensível (100% para amostras pareadas) e específica (98.4%), apesar de uma proporção significativa dos doentes (33.3%) não ter sido diagnosticada por este método na abordagem inicial, utilizando apenas a amostra de soro da fase aguda. Neste estudo, a utilização de uma técnica de ELISA para detecção de IgA anti-*M. pneumoniae* revelou fraca sensibilidade (33.3% para amostras pareadas), provando que esta não é relevante para o

diagnóstico desta infecção em crianças. A combinação dos resultados obtidos por PCR e por *capture*-ELISA permitiu obter uma sensibilidade de 100% em crianças na fase precoce da doença. Assim, se os resultados da PCR e da *capture*-ELISA forem ambos positivos, o diagnóstico pode ser considerado definitivo; se apenas um dos resultados for positivo, a antibioterapia eficaz contra micoplasmas é fortemente recomendada, apesar de ser necessária a confirmação do diagnóstico por uma segunda amostra de soro.

7 CONCLUSÕES

Apesar do recurso a vários métodos de diagnóstico, em cerca de 40 a 60% das PAC o agente etiológico não é identificado (Sociedade Portuguesa de Pneumologia, 2003). Se, por um lado, há uma evidente responsabilidade dos agentes virais nesse grupo de pneumonias sem etiologia determinada, as limitações dos métodos de diagnóstico microbiológico actualmente utilizados na maior parte dos laboratórios clínicos parecem também condicionar estes números. Muitos estudos que comparam métodos de diagnóstico microbiológico directos e indirectos revelam uma correlação pobre entre a resposta imunitária humoral e a detecção de material genético do patógeno atípico, fruto das limitações inerentes às técnicas. A solução apontada para o problema tem sido o recurso à combinação de técnicas directas e indirectas que, tal como se verificou em alguns estudos revistos neste trabalho, parece aumentar a acuidade diagnóstica; porém, esta abordagem aumenta a complexidade e os custos laboratoriais.

O diagnóstico etiológico das CAP, em especial o das pneumonias atípicas, continua a ser um assunto controverso na Medicina a nível mundial. As diferenças entre as *guidelines* de cada país são demonstrativas da incerteza de que se reveste o tratamento empírico das PAC. A postura adoptada neste campo pode ter implicações a nível do tempo de hospitalização, da mortalidade e dos custos associados às hospitalizações por PAC (Arnold FW, et al. 2007). Questiona-se a necessidade do investimento em novos métodos de diagnóstico microbiológico das PAC quando muitas vezes o tratamento empírico, que pode ou não incluir inicialmente antibióticos com actividade contra microrganismos atípicos, é suficiente para a resolução do quadro clínico. A noção de que a maioria das pneumonias por *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* têm uma gravidade ligeira a moderada e uma evolução favorável argumenta fortemente contra uma postura mais interventiva em termos de diagnóstico etiológico.

Acresce que os custos das técnicas de diagnóstico microbiológico são habitualmente elevados, em particular os das técnicas de PCR; neste sentido, novas técnicas de amplificação molecular menos dispendiosas e com menor exigência técnica têm surgido. Por outro lado, não se podem ignorar as consequências negativas do tratamento ineficaz, da antibioterapia de largo espectro desnecessária ou do aumento do tempo de internamento, da morbilidade e da mortalidade, pela ausência de um diagnóstico definitivo estabelecido, quer em termos económicos, quer em termos de saúde comunitária. Urge, por isso, a realização de estudos que avaliem a relação custo-benefício da investigação microbiológica intensiva das pneumonias atípicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreu LM, et al. (2006) Diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(1):19-23.
- Arnold FW, et al. (2007) A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 175:1086-1093.
- Atkinson TP, Balish MF, Waites KB (2008) Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 32: 956-973.
- Bébéar C-M (2007) Physiopathologie et diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae*. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 47:438-41.
- Beersma MFC, et al. (2005) Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the “gold standard”. *J Clin Microbiol* 43(5):2277-2285.
- Bèssède E, et al. (2010) Evaluation of the combination of the NucliSENS easyMAG® and the EasyQ® applications for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory tract specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:187-190.
- Carrillo JA, et al. (2009) Development and evaluation of a multiplex test for the detection of atypical bacterial DNA in community-acquired pneumonia during childhood. *Clin Microbiol Infect* 15:473-480.
- Cimolai N (2008) Comparison of commercial and in-house immunoblot assays for the rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Infect Chemother* 14:75-76.
- Cunha BA (2006) The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect* 12(3):12-24.

- Cunha BA (2008a) Atypical pneumonias: current clinical concepts focusing on Legionnaires' disease. *Curr Opin Med* 14:183-194.
- Cunha BA (2008b) The clinical diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*: the diagnostic importance of highly elevated serum cold agglutinins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:1017-1019.
- Cunha CB (2010) The first atypical pneumonia: the history of the discovery of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Dis Clin N Am* 24:1-5.
- Daxboeck F, et al. (2005) Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in serum specimens from patients with mycoplasma pneumonia by PCR. *International Journal of Medical Microbiology* 295:279-285.
- Dumke R, Jacobs E (2009) Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 47:441-444.
- Eaton MD, Meikeljohn G, van Herick W (1944) Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos. *J Exper Med* 79:649.
- Gouriet F, Drancourt M, Raoult D (2006) Multiplexed serology in atypical bacterial pneumonia. *Ann N Y Acad Sci* 1078:530-540.
- Gouriet F, et al. (2008) Comparison of the new InoDiag automated fluorescence multiplexed antigen microarray to the reference technique in the serodiagnosis of atypical bacterial pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 14:1119-1127.
- Gullsby K, Storm M, Bondeson K (2008) Simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 46(2):727-731.

- Higgins RR, et al. (2009) Verification of the ProPneumo-I assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* in clinical respiratory specimens. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8:10.
- Honderlick P, et al. (2006) La detection par une PCR multiplex de bactéries responsables de pneumopathies atypiques améliore-t-elle les performances du diagnostic microbiologique des infections du tractus respiratoire? *Pathol Biol* 54:467-469.
- Kashyap B, et al. (2008) Comparison of PCR, culture & serological tests for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in community-acquired lower respiratory tract infections in children. *Indian J Med Res* 128:134-139.
- Kishimoto T, et al. (2009) Assay of *Chlamydia pneumoniae*-specific IgM antibodies by ELISA method – Reduction of non-specific reaction and resetting of serological criteria by measuring IgM antibodies. *Jpn J Infect Dis* 62:260-264.
- Korppi M, et al. (2008) The value of clinical features in differentiating between viral, pneumococcal and atypical bacterial pneumonia in children. *Acta Pædiatrica* 97:943-947.
- Krüger S, et al. (2009) Inflammatory parameters predict etiologic patterns but do not allow for individual prediction of etiology in patients with CAP – Results from the German competence network CAPNETZ. *Respiratory Research* 10:65.
- Liu F, et al. (2007) Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children by polymerase chain reaction. *J Microbiol Immunol Infect* 40:507-512.
- Liu F, et al. (2008) Do serological tests provide adequate rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection? *Jpn J Infect Dis* 61:397-399.
- Loens K, et al. (2008a) Development of real-time multiplex nucleic acid sequence based amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella* spp. in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 46:185-191.

- Loens K, et al. (2008b) Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella spp.* in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. *Journal of Microbiological Methods* 73:257-62.
- Mitchell SL, et al. (2009) Evaluation of two real-time PCR chemistries for the detection of *Chlamydomphila pneumoniae* in clinical specimens. *Mol Cell Probes* 23:309-311.
- Miyashita N, et al. (2011) Clinical potencial of diagnostic methods for the rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:439-446.
- Morozumi M, et al. (2006) Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. *Can J Microbiol* 52:125-129.
- Murdoch DR, Chambers ST (2009) Atypical pneumonia – time to breathe new life into a useful term? *Lancet Infect Dis* 9:512-19.
- Nilsson AC, Björkman P, Persson K (2008) Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC Microbiology* 8:93.
- Otomo S, et al. (2008) Analysis of children with *Chlamydomphila (Chlamydia) pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections by real-time PCR assay and serological tests. *APMIS* 116:477-83.
- Ozaki T, et al. (2007) Utility of a rapid diagnosis kit for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children, and the antimicrobial susceptibility of the isolates. *J Infect Chemother* 13:204-7.
- Pignanelli S, et al. (2009) Simultaneous use of direct and indirect diagnostic techniques in atypical respiratory infections from *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Lab Anal* 23:206-209.

- Pitcher D, et al. (2006) Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with an internal processing control. J Med Microbiol 55:149-155.
- Rätty R, Rönkkö E, Kleemola M (2005) Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. J Med Microbiol 54:287-291.
- Saito R, et al. (2005) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J Med Microbiol 54:1037-1041.
- Sociedade Portuguesa de Pneumologia, Comissão de Infecçologia Respiratória (2003) Portuguese Respiratory Society guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. Rev Port Pneumol. 9:435-61.
- Souliou E, et al. (2007) Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26:513-515.
- Templeton KE, et al. (2005) Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 41:345-351.
- Thurman KA, et al. (2009) Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in community outbreaks. Clin Infect Dis 48:1244-49.
- Villegas E, Sorlózano A, Gutiérrez J (2010) Serological diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection: limitations and perspectives. Clin Microbiol Infect 14:1119-27.
- Waites KB, Balish MF, Atkinson TP (2008) New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Future Microbiol. 3(6):635-48.
- Winchell JM, et al. (2008) Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation. J Clin Microbiol 46:3116-18.
- Zaki MES, Goda T (2009) Clinico-pathological study of atypical pathogens in community-acquired pneumonia: a prospective study. J Infect Developing Countries 3(3): 199-205.