



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **Doença de Whipple Um diagnóstico difícil**

**Marta Andrade Fevereiro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Doutor Rui Miguel Monteiro Ramos

**Covilhã, maio de 2013**



# Agradecimentos

À Faculdade de Ciências da Saúde, por ter sido o local onde adquiri todas as competências clínicas necessárias à minha formação médica, bem como competências humanas de entreajuda, respeito e humildade.

Ao Dr. Rui Ramos, pela disponibilidade e orientação para a realização desta dissertação.

À Dra. Rosa Saraiva, pela disponibilidade e ajuda durante a pesquisa bibliográfica.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida, pelo amor e pelos valores que me transmitiram ao longo destes anos e pelos gestos, palavras, conselhos e críticas que me fizeram crescer.

Ao meu irmão, por ter estado sempre presente, pelas brincadeiras e discussões e por todos os ensinamentos que me transmitiu e que me melhoraram enquanto pessoa.

Aos meus amigos/as, especialmente à Filipa e Maria, pelas gargalhadas, desabaços, pelo companheirismo e por terem sido como uma família para mim.

Ao João, por ser o meu braço direito, por me ter levantado quando pensei que ia cair, por me arrancar um sorriso quando mais precisei, por todo o amor e apoio que me transmite.

Aos meus avós, em particular à minha avó Ivone, que apesar de já não estar presente fisicamente, foi uma pessoa fundamental e insubstituível na minha vida e que me acompanhou sempre no meu crescimento.



# Resumo

A doença de Whipple é uma doença bacteriana, multissistêmica e rara. O agente etiológico é a bactéria *Tropheryma whipplei*, um bacilo gram-positivo da família das Actinobacterias e do grupo Actinomycetes. Por ser uma doença sistêmica, a doença de Whipple tem manifestações clínicas muito variadas com particular envolvimento do intestino delgado, do sistema nervoso central, das articulações e do coração. A forma mais comum de apresentação inicial é na forma de uma doença gastrointestinal manifestando-se como uma síndrome de má absorção com dor abdominal, diarreia e perda ponderal. A obtenção de biópsias do intestino delgado e de outros órgãos acometidos, com base nos sintomas do paciente, constitui a abordagem primária e mais usada de diagnóstico da doença. O tratamento é à base de antibioterapia prolongada, porém o melhor esquema terapêutico ainda não está completamente definido. Para além disso, mesmo quando detetada e adequadamente tratada, a sua evolução clínica tem de ser monitorizada durante a terapêutica, bem como por vários anos após o término desta, de modo a evitar recidivas tardias.

Cerca de um século após a sua primeira descrição, a compreensão da doença de Whipple ainda é limitada. No entanto, nos últimos anos foram feitas várias investigações que resultaram em novas pistas na caracterização desta doença e do seu agente etiológico, bem como na abordagem diagnóstica e terapêutica. Apesar da presença ubiqüitária do *Tropheryma whipplei*, a doença de Whipple é muito rara, com fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro a poderem influenciar o curso da doença. Dado que as características clínicas da doença de Whipple clássica são muito inespecíficas, o diagnóstico é frequentemente um desafio. Para além disso, pode manifestar-se de forma localizada ou sob a forma de uma infeção aguda auto-limitada, formas que não se enquadram no conceito clássico da doença. Por estas razões, a doença de Whipple nem sempre é diagnosticada, com significativo prejuízo para a sobrevivência dos doentes, sendo na maioria dos casos descritos identificada tardiamente. Como tal, leva à necessidade de um estabelecimento rápido de um diagnóstico e de uma ampla exploração clínica em cada caso.

Desta forma, esta tese de mestrado, baseada na revisão bibliográfica de artigos publicados sobre o tema, tem como objetivo analisar características epidemiológicas, clínicas, diagnósticas e terapêuticas em relação à doença de Whipple. Visa também demonstrar a necessidade da doença estar presente no diagnóstico diferencial dos casos suspeitos e incentivar à realização de mais investigação.

## Palavras-chave

*Tropheryma whipplei*, Doença de Whipple, Patogenia, Diagnóstico, Tratamento



# Abstract

Whipple's disease is a bacterial, multisystemic and rare disease. The etiological agent is the bacterium *Tropheryma whipplei*, a gram-positive bacillus of the family Actinobacteria and Actinomycetes group. Being a systemic disease, Whipple's disease has varied clinical manifestations with particular involvement of the small intestine, central nervous system, joints and heart. The most common initial presentation is in the form of a gastrointestinal disorder manifesting itself as a malabsorption syndrome with abdominal pain, diarrhea and weight loss. Biopsies from the small intestine and from other organs affected, based on the patient's symptoms, are the primary approach most often used to diagnose disease. The treatment is based on prolonged antibiotic therapy, but the best treatment regimen is not yet fully defined. In addition, even when properly detected and treated, its clinical evolution needs to be monitored during therapy and for several years after its completion so as to prevent late relapses.

Nearly a century after its first description, the understanding of Whipple's disease is still limited. However, in recent years several investigations have been made that have resulted in new insights in the characterization of the disease and its causative agent, as well as diagnostic and therapeutic approach. Despite the ubiquitous presence of *Tropheryma whipplei*, the Whipple's disease is very rare, with genetic and immunological factors of the host that may influence the course of disease. Since the clinical features of classic Whipple's disease are very nonspecific, the diagnosis is often a challenge. In addition, it can manifest itself in a localized way or in the form of a self-limited acute infection, forms that do not fit the classical concept of the disease. For these reasons, Whipple's disease is not always diagnosed with significant detriment to the survival of patients, and in the most cases described it is lately diagnosed. As such, leads to the need for a rapid establishment of a broad diagnostic and clinical exploration in each case.

Thus, this master's thesis, based on the literature review of articles published on the topic, aims to analyze epidemiological, clinical, diagnostic and therapeutic aspects regarding Whipple's disease. It also aims to demonstrate the necessity of the disease being present in the differential diagnosis of suspected cases, and encourage the implementation of further investigation.

## Keywords

*Tropheryma whipplei*, Whipple's disease, Pathogenesis, Diagnostic, Treatment



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Palavras-chave .....	v
Abstract.....	vii
Keywords .....	vii
Índice .....	ix
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Acrónimos.....	xv
Capítulo 1. Introdução .....	1
Secção 1.1. Objetivos.....	1
Capítulo 2. Material e métodos .....	3
Capítulo 3. Fundamentação teórica .....	5
Secção 3.1. Perspetiva histórica .....	5
Secção 3.2. Epidemiologia .....	7
Secção 3.3. Agente etiológico.....	8
3.3.1. Filogenia e Genotipagem .....	9
3.3.2. Genoma.....	10
3.3.3. Cultura .....	10
3.3.4. Reservatório .....	11
Secção 3.4. Patogenia .....	11
3.4.1. Deficiência das células T .....	11
3.4.2. Deficiência das células apresentadoras de antigénios .....	13
3.4.3. Indução da apoptose .....	14
Secção 3.5. Apresentação Clínica .....	16
3.5.1. Infeção crónica .....	17
3.5.1.1 Doença de Whipple clássica .....	17
3.5.1.2 Doença de Whipple localizada .....	21
3.5.2. Infeção aguda.....	23

3.5.2.1 <i>T.whipplei</i> como agente de gastroenterite .....	23
3.5.2.2 <i>T.whipplei</i> como agente de pneumonia .....	23
3.5.3. Colonização assintomática .....	23
Secção 3.6. Abordagem diagnóstica .....	24
3.6.1. Endoscopia e análise histológica com coloração de PAS .....	25
3.6.2. Polymerase chain-reaction (PCR) .....	27
3.6.3. Microscopia eletrónica .....	29
3.6.4. Imunohistoquímica .....	29
3.6.5. Cultura .....	29
3.6.6. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) .....	30
3.6.7. Serologia.....	30
3.6.8. Análises laboratoriais .....	30
3.6.9. Exames imagiológicos .....	30
3.6.10. Casos específicos .....	31
Secção 3.7. Diagnóstico Diferencial.....	31
Secção 3.8. Abordagem Terapêutica.....	33
3.8.1. Antibioterapia .....	33
3.8.2. Terapia imunológica.....	36
Secção 3.9. Complicações e seguimento .....	36
3.9.1. Complicações .....	36
3.9.2. Seguimento .....	37
Capítulo 4. Discussão.....	39
Secção 4.1. Perspetivas futuras .....	42
Bibliografia.....	45

# Lista de Figuras

Figura 1- Microscopia eletrónica de células de <i>T. whipplei</i> extracelulares individuais .....	9
Figura 2- Dendrograma exibindo as relações do <i>T.whipplei</i> com outras bactérias representativas dos actinomicetos. ....	9
Figura 3- Modelo que ilustra a patogenia da DW. ....	15
Figura 4- Esquema hierárquico para o diagnóstico de DW. ....	24
Figura 5- EDA (a) e biópsia duodenal (b). ....	25
Figura 6- Detecção PAS de macrófagos em diferentes locais na DW. ....	26
Figura 7- Estratégia diagnóstica para a DW usando técnicas de qPCR. ....	28
Figura 8- Microscopia eletrónica. ....	29
Figura 9- Biópsia duodenal de um paciente com DW ao diagnóstico(a) e após tratamento(b). ....	38



# Lista de Tabelas

Tabela 1- Marcos históricos da DW. ....	6
Tabela 2- Características epidemiológicas da DW. ....	7
Tabela 3- Formas de apresentação clínica da DW. ....	16
Tabela 4- Principais manifestações clínicas da DW clássica. ....	20
Tabela 5- Principais patologias que fazem diagnóstico diferencial com a DW.....	32
Tabela 6- Esquemas terapêuticos usados para a DW. ....	35
Tabela 7- Esquemas cronológicos de seguimento dos doentes. ....	37



# Lista de Acrónimos

AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Antigen-presenting cell
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bim	Bcl-2 interacting mediator of <i>apoptosis</i>
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BHE	Barreira hematoencefálica
DC	Dendritic cells
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Doença de Whipple
EDA	Endoscopia digestiva alta
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FR	Fator reumatóide
G+C	Guanina+Citosina
HEL	Human erythroleukemia cell line
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleucina
IV	Intravenoso
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MOE	Mioarritmia oculofacioesquelética
MOM	Mioarritmia oculomastigatória
NK	Natural killer
PAS	Periodic acid-Schiff
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RM	Ressonância magnética
RpoB	RNA polymerase beta subunit
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SIRI	Síndrome inflamatório de reconstituição imune
SNC	Sistema nervoso central
TC	Tomografia computadorizada

TCD4+	Células T que expressam a proteína de superfície CD4
TGF-β	Tumor growth factor-beta
Th1	Células T helper tipo 1
Th2	Células T helper tipo 2
TMP-SMX	Trimetropim-sulfametoxazol
TNF-β	Tumor necrosis factor-beta
Treg	Célula T reguladora
<i>T.whipplei</i>	<i>Tropheryma whipplei</i>
VS	Velocidade de sedimentação

# Capítulo 1. Introdução

A doença de Whipple é uma infecção sistémica rara que afeta mais frequentemente o intestino delgado, mas que pode atingir quase todos os órgãos do corpo humano. O agente causal é a bactéria *Tropheryma whipplei*, um actinomiceto gram positivo. Os sintomas mais comuns são diarreia e perda ponderal, embora haja um leque bastante vasto de manifestações clínicas extra-intestinais que podem ocorrer. Por ter uma apresentação clínica variada e por se tratar de uma doença rara é muitas vezes diagnosticada tardiamente.<sup>1,2</sup>

Desde a sua descrição há várias décadas, a investigação dos mecanismos patogénicos permitiu a aquisição de novos conhecimentos e novas realidades, com consequências importantes na forma de abordagem da doença, sua terapêutica e da qualidade de vida dos doentes. No entanto, ainda há muitos aspetos desconhecidos acerca desta doença, apesar dos avanços tecnológicos e científicos nesta área. Há, por isso, grande necessidade de se apostar em mais trabalhos científicos e estudos que revelem quais os mecanismos verdadeiramente responsáveis pelo desencadeamento e progressão da doença. Só com estas descobertas será possível, no futuro, o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas cujo objectivo primordial será a cura da doença em fases precoces, com o mínimo de recidivas.

## Secção 1.1. Objetivos

Com esta revisão bibliográfica, visei abordar os principais avanços na área da etiologia, epidemiologia, patogenia, diagnóstico e tratamento da doença. Pretende-se, assim, que este trabalho possa servir de referência para médicos no decurso da sua atividade clínica, bem como para estudantes no seu processo de aprendizagem, e que possa ser útil para uns na forma de atualização de informação ou, para outros, na forma de um instrumento de aquisição de novos conhecimentos. Outro dos objetivos deste trabalho, é que se torne um incentivo à realização de mais investigação sobre esta doença, quiçá através de estudos nacionais, e que esta patologia não seja esquecida, mas sim incluída nos diagnósticos diferenciais, de forma a curar uma doença potencialmente fatal se não for lembrada e considerada.



## Capítulo 2. Material e métodos

A metodologia usada para a realização desta dissertação de mestrado consistiu na pesquisa de artigos científicos, no período compreendido entre Setembro de 2012 e Abril de 2013. Para tal, recorreu-se a bases de dados eletrónicas, tais como a Pubmed, ScienceDirect, EBSCO, B-on, Scielo e ResearchGate, e aos seguintes jornais científicos pertinentes para a área: "Acta médica portuguesa", "American Journal of Clinical Pathology", "Annals of Gastroenterology", "Annals of Internal medicine", "Antimicrobial Agents and Chemoterapy", "Clinical Infectious Diseases", "Current Gastroenterology Reports", "Emerging Infectious Diseases", "Jornal Português de Gastroenterologia", "The Journal of American Medical Association", "The Journal of Antimicrobial Chemotherapy", "The Journal of Clinical Microbiology", "The Journal of Infectious Diseases", "The Journal of Immunology", "The Lancet", "The New England Journal of Medicine", entre outros.

As palavras-chave utilizadas foram: *Tropheryma whipplei*, Whipple disease, epidemiology, pathogenesis, diagnostic e treatment, bem como os seus equivalentes em português.

Os resultados obtidos foram filtrados por ano de publicação tendo sido rejeitados todos os artigos anteriores ao ano de 2000 e usados apenas os de língua inglesa e portuguesa. Percebida a relevância, também se pesquisaram diretamente as referências indicadas não se fazendo neste caso filtragem relativamente ao ano. Assim, a amostra de artigos usada como bibliografia para a elaboração desta monografia data do ano de 1958 até 2013. Foram feitos todos os esforços para obter os estudos mais recentes, bem como aqueles que marcaram alguns dos avanços acerca desta doença, porém alguns não estavam acessíveis. Incluíram-se artigos de revisão, estudos retrospectivos, prospetivos e estudos experimentais. Recorreu-se ainda a um manual de imunologia.



# Capítulo 3. Fundamentação teórica

## Secção 3.1. Perspetiva histórica

A doença de Whipple (DW), assim designada em homenagem a George Hoyt Whipple (1878-1976), foi reconhecida em Maio de 1907 quando o jovem professor de patologia na Universidade de John Hopkins a identificou numa autópsia de um paciente seu. O seu paciente era um médico de 36 anos que apresentava um quadro clínico gradual de febre, emagrecimento, diarreia, tosse e poliartrite, tendo falecido 5 anos após o início dos sintomas. Os achados da autópsia consistiam em polisserosite, lesão valvular aórtica e deposição de lípidos na mucosa intestinal, bem como nódulos linfáticos mesentéricos com marcada infiltração de macrófagos espumosos. Whipple considerou a doença como sendo causada por uma anormalidade no metabolismo lipídico, designando a doença por lipodistrofia intestinal, desvalorizando o microorganismo em forma de bastão observado no tecido infetado.<sup>1</sup>

Cerca de meio século depois, a laparotomia e uma nova técnica de coloração histoquímica ajudou ao diagnóstico histológico, por identificação de uma reação positiva do tecidos infetados ao reagente Periodic Acid-Schiff (PAS)<sup>2,3</sup>. Assim, revelou-se que os depósitos no citoplasma dos macrófagos não continham lípidos mas sim material glicoproteico. Em 1952, foi realizado o primeiro tratamento bem sucedido com antibióticos, nomeadamente o cloranfenicol, o que sugeria fortemente uma causa bacteriana para a doença<sup>3</sup>.

Em 1958, foi feito o primeiro diagnóstico por biópsia do intestino<sup>4</sup> tendo sido em 1960 identificadas bactérias no citoplasma dos macrófagos através da microscopia eletrónica. Desta forma, foi estabelecida a natureza infecciosa da doença ao invés de um distúrbio no metabolismo dos lípidos tal como fora proposto por George Whipple.<sup>2,3</sup>

Entre 1963 e 1970 foi atribuído o carácter multissistémico à DW, uma vez que se demonstrou que a infeção não se limitava ao intestino, podendo assim envolver outros órgãos como o aparelho osteo-articular, sistema nervoso central (SNC) e sistema cardio-vascular<sup>2</sup>.

Apenas no início da década de 90 é que foi possível caracterizar o microorganismo através da análise por Polymerase chain reaction (PCR) da sequência genética 16S rRNA, permitindo a sua classificação no grupo Actinomycetes e denominação de *Trephoryma whipelli* (do grego *trophe*, nutrição, e *eryma*, barreira, uma vez que causa má-absorção, e do nome de George Whipple)<sup>5</sup>. Depois do primeiro isolamento da bactéria<sup>6</sup>, Raoult *et al*<sup>7,8</sup>, em 2000, realizaram a primeira cultura da bactéria por inoculação em linhas celulares originárias de fibroblastos humanos, sendo o nome do bacilo oficialmente corrigido para *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*), em 2001<sup>9</sup>.

Em 2003, é completada a sequência e a análise do genoma bacteriano<sup>10</sup>, condensado em 925.930 pares de bases, genoma inesperadamente pequeno, com ausência de vias fundamentais de biossíntese e capacidade metabólica reduzida. Assim, demonstrou tratar-se

de um organismo com restrita autonomia, sugerindo que a interação com o hospedeiro representa um papel major na sobrevivência do organismo. Desta forma, o conhecimento do genoma iria facilitar a investigação da patogenia da doença e possibilitar o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, tal como a cultura da bactéria *in vitro* sem recurso a células hospedeiras<sup>11,12</sup>. Um século de investigação científica elucidou as complexidades desta doença e do seu agente etiológico (Tabela 1), mas muitas questões continuam sem resposta<sup>3</sup>.

Tabela 1- Marcos históricos da DW. (Adaptado de Afshar *et al*<sup>3</sup>)

Ano	Estudo	Contribuições
1907	Whipple	Primeiro diagnóstico da doença ( <i>postmortem</i> ) referida como lipodistrofia intestinal
1947	Oliver-Pascual <i>et al</i>	Primeiro diagnóstico antemortem por laparotomia
1949	Black-Schaffer	Coloração PAS para diagnóstico
1952	Paulley	Primeiro tratamento com sucesso com cloranfenicol
1958	Bolt <i>et al</i> <sup>4</sup>	Primeira biópsia intestinal para diagnóstico
1961	Chears e Ashworth Yardley e Hendrix	Grupos independentes identificam bactéria por microscopia eletrónica
1963	Enziger e Helwing	Atribuição de carácter multissistémico à doença
1970	Maizel <i>et al</i>	
1991	Wilson <i>et al</i>	Sequenciação do 16s rRNA por PCR de uma bactéria desconhecida homóloga aos actinomicetes
1992	Relman <i>et al</i> <sup>5</sup>	Denominação de <i>Tropheryma whippelii</i> com identificação da sequência 16s rRNA
1997	Schoedon <i>et al</i> <sup>6</sup>	Isolamento da bactéria por desativação dos macrófagos com IL-4
2000	Raoult <i>et al</i> <sup>7</sup>	Primeira cultura do bacilo de Whipple
2001	Raoult <i>et al</i> <sup>8</sup>	Cultura e imunodeteção do <i>Tropheryma whippelii</i> do duodeno de um paciente com DW
	La Scola <i>et al</i> <sup>9</sup>	Bacilo renomeado como uma nova espécie: <i>Tropheryma whipplei</i> , após isolamento de uma válvula cardíaca
2003	Bentley <i>et al</i> <sup>10</sup>	Determinação da sequência genética para duas estirpes isoladas do <i>T. whipplei</i>
	Raoult <i>et al</i> <sup>11</sup>	
	Renesto <i>et al</i> <sup>12</sup>	Desenvolvimento de cultura da bactéria sem recurso a células hospedeiras

## Secção 3.2. Epidemiologia

A DW é uma doença rara<sup>13-15</sup>, embora a sua verdadeira incidência ainda não seja conhecida<sup>14</sup>. Alguns estudos sugerem a ocorrência, em todo o mundo, de aproximadamente 12 novos casos/ano<sup>16</sup>, enquanto que uns apontam para uma frequência da doença de <0,1%<sup>15</sup>. Um estudo epidemiológico da DW foi feito por Dobbins em 1987 com base em 696 pacientes reportados desde 1907 com a doença, revelando que cerca de 86% dos indivíduos afetados são do género masculino<sup>3</sup>, semelhante à percentagem de 80% encontrada por Durand *et al* num estudo de revisão de 52 casos realizado em 1997<sup>2</sup>. Na sua maioria, os indivíduos são de raça caucasiana, residentes na Europa e América do Norte<sup>14</sup>. Poucos casos foram reportados na América do Sul, África, Índia e Austrália. A doença é muito rara nos africanos e apenas dois casos foram descritos nos asiáticos<sup>17</sup>. Em Portugal, existem alguns casos relatados<sup>18-20</sup>, no entanto, foi no país vizinho que foi realizada uma análise extensa de todos os pacientes diagnosticados entre 1947 e 2001, num total de 91 casos<sup>21</sup>. A idade média na altura do diagnóstico é de 49 anos, mas a doença pode surgir em qualquer faixa etária<sup>16</sup>.

Num estudo retrospectivo publicado em 1997 com pacientes maioritariamente alemães, notificou-se uma proporção crescente de doentes do género feminino e idade média de diagnóstico mais tardia, nomeadamente 57 anos de idade<sup>22</sup>. Mais recentemente, em 2010, um estudo de 142 pacientes diagnosticados com DW revelou que 85% dos doentes eram homens com uma idade média de 55 anos<sup>23</sup>.

Uma observação interessante no estudo de Dobbins, foi a predominância da doença nos agricultores e noutros trabalhadores com ocupações que envolviam contacto com o solo e animais, representando cerca de 34% do número total de casos<sup>3</sup>. Esta população em risco foi reafirmada mais recentemente através de estudos europeus envolvendo trabalhadores em estações de águas residuais<sup>13,24,25</sup>. Através de testes de amostras de saliva e fezes dos trabalhadores, estes estudos mostraram uma proporção substancial destes indivíduos como possíveis portadores assintomáticos. Demonstrou-se também uma taxa de co-infecção significativa com a *Giardia lamblia*, apoiando o fator de risco ocupacional<sup>26,27</sup>. A tabela 2 resume os principais dados epidemiológicos da DW.

Tabela 2- Características epidemiológicas da DW. (Adaptado de Abreu *et al*<sup>16</sup>)

Características epidemiológicas da doença de Whipple	
Sexo	Masculino
Raça	Caucasiana
Idade média ao diagnóstico	40-60 anos
População de risco	Agricultores e operários de estações de tratamento de águas residuais
Países	Europa e América do Norte
Incidência	<12 novos casos/ano; <0,1%

A relação filogenética do *T.whipplei* com bactérias presentes no ambiente e o facto de ter sido detetado no solo e em águas de esgoto parece sugerir uma fonte ambiental<sup>13,14</sup>. Por outro lado, existem evidências de que esta bactéria possa pertencer à flora comensal humana; estudos de PCR permitiram identificar a presença do *T.whipplei* em amostras de saliva, suco gástrico e em biópsias duodenais de indivíduos sem a doença<sup>14,28-30</sup>.

Apesar da presumível presença ubiqüitária do *T.whipplei*, tem sido discutida uma predisposição genética para a DW.

O antigénio de histocompatibilidade HLA B27 foi encontrado em pacientes com DW numa proporção maior do que a esperada<sup>31</sup>. Contudo, apesar de uma possível associação entre a DW e o HLAB27 ter sido reportada, estudos subsequentes não confirmaram esses resultados, uma vez que não foi encontrada noutras populações estudadas (argentina, italiana)<sup>2</sup>. Martinetti et al<sup>32</sup> em 2009 realizaram o primeiro grande estudo genómico para identificação de alelos HLA em doentes com DW, nomeadamente alemães, italianos e austríacos. Neste estudo, concluiu-se que os alelos HLA DRB1\*13 e DBQ1\*06 são considerados fatores de risco para a DW.

Foram descritos casos em familiares de doentes portadores de DW<sup>33,34</sup>, mas a maioria dos casos analisados não sugerem componentes familiares. No entanto, em 2012, Fenollar et al<sup>35</sup> conduziram um estudo serológico e molecular de 74 parentes de 13 pacientes com DW e concluíram que existia uma alta prevalência da bactéria entre os familiares.

Alguns clones circulam em comunidades particulares, sugerindo transmissão inter-humana<sup>36,37</sup>.

### Secção 3.3. Agente etiológico

*Trephoryma whipplei*, primariamente designado por *Trephoryma whippelii*, é o microorganismo que está na etiologia da doença de Whipple. Trata-se de um bacilo gram positivo, em forma de bastão, com cerca de 0,25-0,3 µm de diâmetro e 0,8-1,7 µm de comprimento, imóvel e cuja membrana plasmática é rodeada por uma parede fina homogénea e por uma estrutura semelhante a membrana plasmática, resultando numa aparência trilamelar da parede celular através da microscopia eletrónica.<sup>9</sup> (Figura 1)

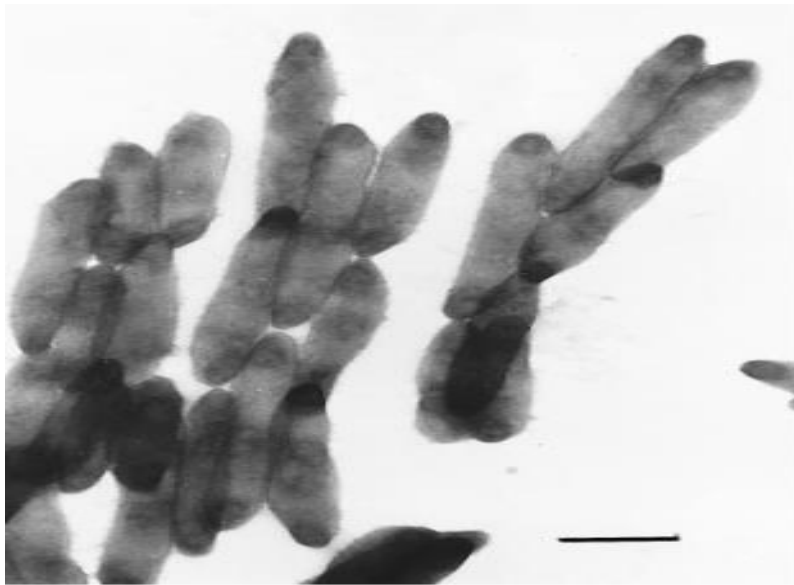


Figura 1- Microscopia eletrónica de células de *T. whipplei* extracelulares individuais. (Fonte: Scola *et al*<sup>9</sup>)

### 3.3.1. Filogenia e Genotipagem

O *T. whipplei* é um actinomiceto, da classe *Actinobacteria*, e encontra-se na posição intermédia entre a família *Cellulomonadaceae* (grupo regular com peptidoglicanos do tipo A) e outro grupo de actinomicetos com peptidoglicanos do grupo B<sup>38</sup>. (Figura 2)

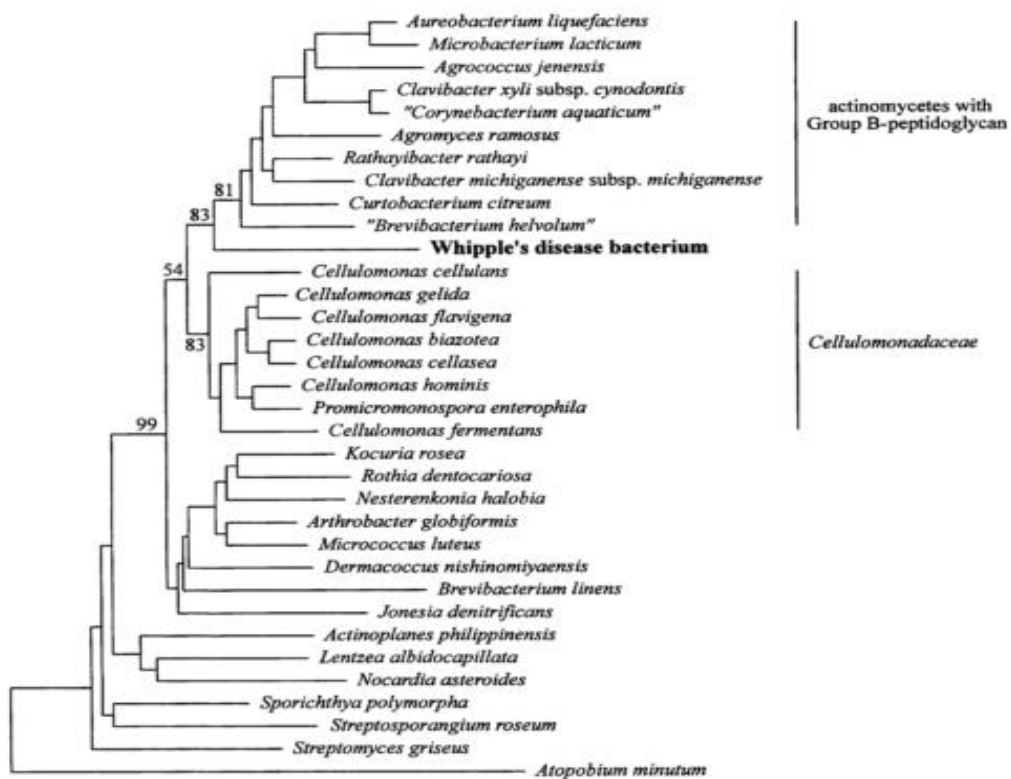


Figura 2- Dendrograma exibindo as relações do *T. whipplei* com outras bactérias representativas dos actinomicetos. (Fonte: Maiwald *et al*<sup>38</sup>)

A maioria das bactérias nestes dois grupos são patogénios ambientais (solo e água) ou fitopatogénios. No entanto, a relação do *T.whipplei* com essas bactérias são bastante distantes: a sequência 16s rRNA difere da bactéria mais próxima de 8%.<sup>38</sup>

Diferenças entre estirpes de *T.whipplei* foram exploradas na sequência da região separadora intergénica 16s-23s rRNA<sup>39,40</sup>, sendo a região separadora tipo 2 a mais comum<sup>40</sup>. A mesma região pode ser detetada em diferentes tipos de amostras no mesmo paciente, o que sustenta o carácter sistémico da DW<sup>40</sup>.

A primeira estirpe isolada foi denominada Twist-Marseille e descrita como a estirpe típica da espécie<sup>9</sup>. Em 2008, Fenollar et al<sup>41</sup> revelou que existe uma alta diversidade genética das estirpes de *T.whipplei* que aparentemente são independentes da distribuição geográfica e sem relação com a patogenicidade da bactéria.

### 3.3.2. Genoma

O *T.whipplei* possui o genoma mais pequeno encontrado entre os actinomicetos<sup>10,11</sup>, tendo a particularidade de conter G+C numa percentagem de apenas 46%, ao contrário dos restantes membros da mesma classe que são ricos nessas duas bases<sup>10</sup>. Para além disso, tem uma evolução genómica muito reduzida, dado que carece de várias vias de metabolismo energético e de hidratos de carbono, bem como de importantes vias de síntese de aminoácidos. Tal facto, sugere que o *T.whipplei* se tornou um organismo dependente do hospedeiro que depende da absorção de nutrientes pré-formados por uma fonte externa.<sup>10</sup>

### 3.3.3. Cultura

Durante muito tempo pensou-se que a bactéria responsável pela DW não fosse cultivável, no entanto a caracterização do microorganismo baseada na sequência 16s rRNA no início dos anos 90 renovou o interesse pela bactéria<sup>5</sup>. Sete anos depois, Schoeden et al<sup>6</sup> isolaram e propagaram a bactéria em monócitos do sangue periférico desativados com IL-4, IL-10 e dexametasona, apesar de não terem conseguido obter culturas estáveis. Foi apenas no ano 2000, que outra estratégia foi usada através da inoculação na linhagem celular das células HEL fibroblásticas, tendo culminado em propagações da bactéria bem sucedidas<sup>7</sup>. O tempo estimado para a duplicação das bactérias foi de 18 dias, o que é extremamente demorado para uma bactéria<sup>7</sup>. Em estudos subsequentes, os tempos de duplicação estimados variam entre 32 horas a 4 dias<sup>42,43</sup>.

### 3.3.4. Reservatório

O DNA do *T.whipplei* foi detetado em 66% das amostras de esgoto na Alemanha e em 37% das afluências às estações de tratamento de águas residuais, bem como em 25% das amostras de fezes dos trabalhadores que contactam com águas residuais<sup>13,24</sup>. As bactérias do solo e da água tendem a concentrar-se no esgoto para formar comunidades, no qual uma grande variedade de microorganismos são encontradas, logo tais achados podem sugerir uma fonte ambiental do *T.whipplei*<sup>13</sup>. No entanto, também foram detetadas bactérias na saliva, suco gástrico e amostras de biópsia de duodeno de pessoas sem DW, revelando a possibilidade da existência de um reservatório humano<sup>29,30</sup>.

Uma vez que a bactéria pode ser detetada em fezes humanas, nomeadamente nos trabalhadores de estações de tratamento águas residuais<sup>24</sup> e em zonas de pobres condições higiénicas<sup>37</sup>, poderá ser considerada comensal adquirida por transmissão fecal-oral.

Esta bactéria apresenta uma resposta adaptativa ao stress térmico, o que lhe permite sobreviver em condições climáticas desfavoráveis<sup>44</sup>.

## Secção 3.4. Patogenia

O *T.whipplei* foi localizado primariamente nas células epiteliais na lâmina própria<sup>45</sup>. Apesar de não se saber como a bactéria entra no organismo, ela pode ser encontrada intracelularmente<sup>8</sup> ou metabolicamente ativa extracelularmente<sup>45</sup> na mucosa intestinal.

A bactéria replica-se dentro dos macrófagos da lâmina própria até ocorrer apoptose das células do hospedeiro, disseminando a bactéria. A partir daqui, a infeção bacteriana manifesta os seus efeitos multissistémicos inicialmente por propagação via linfática, culminando em propagação hematogénea.<sup>46</sup>

No entanto, a natureza exata dos fatores do hospedeiro que permitem a evolução para uma infeção sistémica crónica é assunto de discussão, dado que existem vários defeitos na imunidade mediada por células nos doentes com DW crónica<sup>47</sup>.

### 3.4.1. Deficiência das células T

Os pacientes com DW revelam um número de funções das células T desreguladas que se pensa que permitam o estabelecimento de uma infeção crónica<sup>47</sup>.

Imunologicamente falando, temos dois tipos de linfócitos T CDA4+: os linfócitos TCD4+ helper do tipo 1 (Th1) e TCD4+ helper do tipo 2 (Th2).

Os linfócitos Th1 estão envolvidos na regulação de respostas celulares através da secreção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ , para promoção de respostas imunológicas contra bactérias e vírus.

De acordo com o modelo de diferenciação aceite, a ativação de um linfócito T CD4+ *naive* por uma célula dendrítica resulta na secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$  pela célula apresentadora de antígenos (APC) e no aumento da expressão do recetor para a IL-12 e IFN- $\gamma$  pelo linfócito. Isto resulta na transcrição de genes para as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ .

Os linfócitos Th2 estão envolvidos na regulação de respostas humorais, através da secreção de citocinas como a IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, algumas das quais ajudam os linfócitos B a proliferar e a diferenciarem-se em plasmócitos. Estas citocinas inibem a diferenciação em Th1.

Geralmente, as respostas Th1 são mais efetivas contra patógenos intracelulares enquanto que as Th2 são para bactérias extracelulares, parasitas e toxinas.<sup>48</sup>

Durante a fase ativa da DW, os pacientes apresentam uma reduzida reação cutânea aos antígenos “de memória”, revelando uma reduzida reação de hipersensibilidade tipo tardia, bem como uma redução na percentagem de células Th1 no sangue periférico e lâmina própria do duodeno, tecido com maior carga de patógenos<sup>49</sup>. Aparentemente, como evidência de uma atividade diminuída de células Th1, as células T no sangue periférico bem como na lâmina própria de pacientes com DW produzem apenas quantidades reduzidas de IFN- $\gamma$ <sup>49</sup>, enquanto que os indivíduos saudáveis apresentam uma reatividade Th1 protetora contra o agente<sup>50</sup>.

Contrariamente, a resposta Th2 funcional que apenas ineficazmente protege de patógenos intracelulares, aumenta nos linfócitos do sangue periférico e mucosa duodenal dos doentes com DW, apoiando a observação de que os níveis de IL-4 estão aumentados, contrariamente aos níveis das citocinas clássicas típicas da resposta Th1<sup>49</sup>.

Pode ser sugerida uma supressão adicional da atividade das células T, dado que as células T CD4+ reguladoras (Treg) estão em maior número na mucosa duodenal dos indivíduos com DW e revelam uma atividade avançada no sangue periférico destes pacientes<sup>51</sup>.

Os linfócitos Treg são diferentes dos Th1 e Th2, dado que são capazes de suprimir respostas imunológicas mediadas por outros linfócitos T, sendo o mecanismo mediado por citocinas inibidoras (ex.: IL-10 e TGF- $\beta$ ). Assim, permitem suprimir respostas mediadas por linfócitos T auto-reativos quer em situações não-inflamatórias, inflamatórias ou transplantes.<sup>48</sup>

A resposta reduzida dos pacientes com DW à bactéria revelou ser independente da atividade da doença e do tratamento. Assim, V. Moos *et al*<sup>50</sup>, sugeriram que um defeito imunitário específico possa contribuir para a suscetibilidade muito rara para a bactéria ubiquitária. Esta hipótese é suportada pelo facto de imunodeficiências de CD4 (ex.: SIDA) não se

correlacionarem com uma incidência mais frequente da doença, bem como pelo facto de pacientes com DW não padecerem de infeções oportunistas mais frequentemente do que a população em geral<sup>50</sup>. Apenas a giardíase, foi associada à DW<sup>27</sup>.

Assim, a anergia das células T ou a atividade das células T reguladoras não parecem explicar a falta de responsividade que se observa na DW, tendo então os macrófagos uma importância central no desenvolvimento da doença.

No entanto, não puderam excluir que o actinomiceto representa um papel importante na indução deste defeito<sup>50</sup>.

### 3.4.2. Deficiência das células apresentadoras de antígenos

Uma das características mais marcantes da DW é a acumulação na lâmina própria de macrófagos contendo numerosas bactérias. Logo, foi sugerida uma disfunção macrófaga<sup>52</sup>.

Análises recentes revelam que os macrófagos dos pacientes com DW apresentam uma habilidade persistentemente reduzida para degradar organismos intracelulares e uma expressão reduzida do recetor 3- $\alpha$  CD11b do complemento, envolvido na fagocitose<sup>53</sup>.

Mais recentemente, uma produção baixa de IL-12 pelos monócitos, com redução dos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelas células mononucleares, sugeriu uma ativação comprometida dos macrófagos<sup>54</sup>, apesar de manterem a capacidade de produzir níveis normais de TNF- $\beta$ <sup>49</sup>.

IL-12 é uma citocina produzida pelas células da imunidade inata (principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas) e tem um papel essencial na ativação das células NK e na diferenciação das células T *naive*. Ela induz a produção de IFN- $\gamma$ , favorece a diferenciação das células Th1 e forma uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa.

O IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos para promover uma resposta efetiva contra os patógenos, resultando em morte intracelular. Assim, uma produção reduzida de IL-12 vai resultar numa produção baixa de IFN- $\gamma$  pelas células NK e células T, e portanto, resulta numa ineficaz ativação e função dos macrófagos. Esta hipótese foi apoiada por um estudo realizado num paciente em que a suplementação de IFN- $\gamma$  à terapia antibiótica resultou na erradicação na bactéria.<sup>53,55</sup>

Para além disso, na mucosa duodenal dos pacientes com DW, podem ser encontrados macrófagos com um fenótipo alternativo ativado, promovido pelos baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-4. Estas células expressam baixos níveis de IL-12, quantidades elevadas de IL-10, induzem tolerância aos antígenos ambientais e dificultam a defesa antibacteriana pela subregulação dos níveis de TCD4+. Este fenótipo alternativo dos macrófagos pode favorecer o desenvolvimento de respostas Th2 com inibição da resposta Th1, o que pode explicar a resposta Th1/Th2 desregulada.<sup>50,52,53</sup>

Para além dos macrófagos, também os monócitos do sangue periférico dos doentes com DW revelam uma ativação alternativa que é precipitada pelo *T. whipplei* em si<sup>52</sup>, em concordância

com a observação prévia de que o *T.whipplei* se replica nos monócitos humanos desativados com IL-4 e IL-10 in vitro<sup>6</sup>.

Foi revelado um conjunto de citocinas envolvido na diferenciação das APC que influenciam a sobrevivência do *T.whipplei*. O IFN do tipo 1 é importante para manter a infecção nos macrófagos<sup>56</sup> e o IL-16 foi identificado como um fator de crescimento para o *T.whipplei*. A bactéria estimula a libertação de IL-16 nos macrófagos derivados dos monócitos humanos, replica-se nos macrófagos e monócitos após tratamento com IL-16, e o seu crescimento pode ser inibido por anticorpos que neutralizam o IL-16<sup>57</sup>.

A replicação do *T.whipplei* foi associada à indução da apoptose dos macrófagos<sup>57</sup>. A indução da apoptose está provavelmente ligada com a produção de IL-16 uma vez que a caspase 3 cliva o pro-IL-16 para produzir IL-16 biologicamente ativo<sup>58</sup>.

Como tal, em pacientes com DW, o IL-16 circulante e os níveis de marcadores de apoptose correlacionam-se e foram propostos como ferramentas de prognóstico<sup>59</sup>.

Como resultado de uma função macrofágica deficiente combinada com as citocinas, a bactéria invasora é ingerida mas não é destruída pelos macrófagos intestinais, persistindo nos fagossomas<sup>52</sup>.

Também as células dendríticas, que são as APC mais abundantes na lâmina própria, podem ser influenciadas pelas citocinas anti-inflamatórias induzidas pelo *T.whipplei* e por activação macrofágica alternativa. A ausência de IFN- $\gamma$  e IL-12 combinada com a presença de IL-10 e IL-16, pode inibir a maturação e induzir o desenvolvimento de células dendríticas tolerogénicas.<sup>47</sup>

Atividade tolerogénica é a capacidade das células dendríticas inibirem a ativação de linfócitos T reativos e aumentarem o número de linfócitos Treg<sup>48</sup>.

Assim, a apresentação antigénica deficiente e a co-estimulação insuficiente podem ser responsáveis pela falha da eliminação imunológica do *T.whipplei* em pacientes com DW.

### 3.4.3. Indução da apoptose

A indução da apoptose pode ser mediada por duas vias distintas: a via dos recetores da morte celular, ou via extrínseca, e a via mitocondrial, ou via intrínseca.

A primeira via envolve a ativação da caspase 8 iniciadora, que por sua vez irá ativar através da proteólise, outras caspases, nomeadamente a caspase 3, 6 e 7, envolvidas na degradação de proteínas celulares.

A segunda via é regulada por membros da família Bcl-2, constituídos por proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, que controlam o destino do linfócito T, quer pela destruição ou proteção da mitocôndria. As proteínas pró-apoptóticas pertencem ao grupo Bim, Bad, Bax e Bak, sendo responsáveis pela permeabilização da membrana mitocondrial, levando à liberação do citocromo c. O citocromo c associa-se ao fator pró-apoptótico Apaf-1, permitindo a ligação da pró-caspase 9 que, conseqüentemente, se torna ativa e irá ativar outras caspases por proteólise.<sup>48</sup>

Estudos acerca das vias da apoptose induzidas pelo *T.whipplei* revelaram que a iniciação da mesma requer a ativação da caspase 8 e 10, enquanto que a 9 e a 2 não estavam envolvidas, sugerindo o envolvimento da via extrínseca. A inibição da caspase 3 e 6 resultou numa notável redução da apoptose induzida por *T.whipplei*, possivelmente por diminuir a liberação de IL-16.<sup>60</sup> A apoptose dos macrófagos também mostrou ser dependente da resposta IFN tipo 1 induzida pelo *T.whipplei*, esta última responsável pela ativação da caspase 8. Assim, macrófagos deficientes para o recetor IFN tipo 1 não entram em apoptose e exibem atividade bactericida contra o *T.whipplei* confirmando o papel crítico da apoptose na patogenia do *T.whipplei*, nomeadamente da via dos recetores da morte celular.<sup>57,60</sup>

Baseado nos achados das funções dos macrófagos e das células T na DW, Schneider *et al*<sup>22</sup> propuseram um modelo de imunopatogenia. (Figura 3)

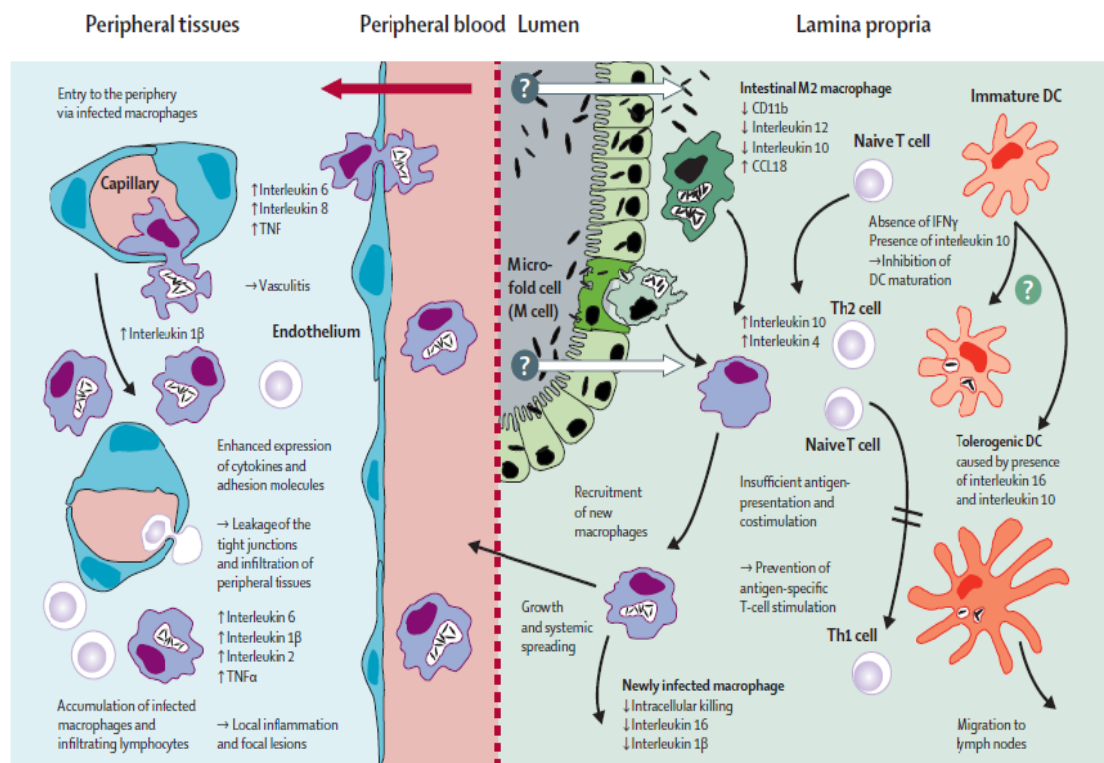


Figura 3- Modelo que ilustra a patogenia da DW. DC-célula dendrítica TNF  $\alpha$ - fator de necrose tumoral  $\alpha$ .(Fonte: Schneider *et al*<sup>22</sup>)

Em suma, uma maturação inapropriada das células apresentadoras de antígenos causada pela presença de IL-10 e IL-16, e pela ausência de IFN- $\gamma$  e IL-12, pode levar a apresentação antígenica ineficaz, resultar em distúrbios da fagocitose e inibir a estimulação de células Th1 na periferia, permitindo a propagação sistémica do *T.whipplei*<sup>22</sup>.

### Secção 3.5. Apresentação Clínica

A DW habitualmente apresenta-se tal como Whipple descreveu originalmente, com infeção do intestino delgado levando a um síndrome de má-absorção, acompanhado de adenopatias mesentéricas, precedida por sintomas mais subtis, nomeadamente articulares. No entanto, o *T.whipplei* tem a particularidade de provocar uma doença multissistémica e daí poder ser encontrado numa variedade de tecidos, tais como a pele, cérebro, olhos, pulmão, válvulas cardíacas, miocárdio, pericárdio, nódulos linfáticos, entre outros.<sup>61</sup>

A DW pode-se dividir em infeção crónica e aguda, podendo também ocorrer sob a forma de colonização assintomática. (Tabela 3) A infeção crónica, por sua vez, subdivide-se em DW clássica, caracterizada por envolvimento histológico digestivo e DW localizada com ausência de envolvimento digestivo.<sup>61</sup>

Tabela 3- Formas de apresentação clínica da DW. (Adaptado de Desnues *et al*<sup>61</sup>)

Apresentação clínica da doença de Whipple	
<b>Infeção crónica</b>	
Doença de Whipple clássica	Fase prodrómica
	Fase sistémica
	Fase neurológica
Doença de Whipple localizada	Endocardite
	DW neurológica isolada
	Uveíte
	Envolvimento osteoarticular
	Envolvimento pulmonar
<b>Infeção aguda</b>	
	Gastroenterite
	Pneumonia
<b>Colonização assintomática</b>	
	Fezes
	Saliva
	Amostras de biópsia duodenal

### 3.5.1. Infecção crónica

#### 3.5.1.1 Doença de Whipple clássica

Esta forma de doença afeta a maioria dos doentes diagnosticados e apresenta um envolvimento sistémico, sendo a manifestação crónica mais frequente provocada pelo *T. whipplei*. O curso da DW clássica pode ser dividido em 3 fases: prodrómica, sistémica/gastrointestinal e neurológica.<sup>15,23,61,62</sup>

A tabela 4 resume as principais manifestações clínicas da DW clássica com as respetivas percentagens de frequência de ocorrência.

#### Fase prodrómica

Constituído principalmente por sintomas articulares (65-90%), nomeadamente artralgia ou artrite, tratando-se da manifestação extraintestinal mais comum<sup>15</sup>. A artralgia/artrite é habitualmente migratória, intermitente<sup>61</sup>, com afetação oligo ou poliarticular<sup>15</sup> e ocorre principalmente nas articulações periféricas e maiores<sup>3</sup>. Os episódios articulares são geralmente agudos e duram desde horas até poucos dias<sup>63</sup>. As articulações mais afetadas são joelhos, pulsos e tornozelos<sup>64</sup>.

Raramente leva a deformações invalidantes e destrutivas e auto-anticorpos específicos para artrites não são normalmente detetados, nem quaisquer anormalidades radiográficas<sup>62,63</sup>. As formas destrutivas refletem progressão prolongada sem tratamento, sendo estas lesões bilaterais e simétricas<sup>64</sup>.

A descrição da afetação articular é importante dado que é nesta fase que o profissional de saúde deve considerar o diagnóstico mesmo na ausência de outros sinais cardinais da infeção. No entanto, a doença não é habitualmente diagnosticada, dado que o *T.whipplei* não é conhecido por ser frequentemente envolvido em oligo ou poliartrite seronegativa indiferenciada<sup>64</sup>.

Esta fase dura cerca de 7-8 anos e dá lugar à fase sistémica/gastrointestinal<sup>62</sup>, apesar de poder preceder as outras manifestações em até 36 anos<sup>64</sup>. Devido a causas desconhecidas, a dor articular diminui após o desenvolvimento dos sintomas intestinais<sup>63</sup>.

## Fase gastrointestinal/sistêmica

As principais manifestações gastrointestinais são sintomas de síndrome de má-absorção intestinal, tais como diarreia, perda de peso, dor abdominal, edema periférico, anemia, entre outros<sup>22</sup>. Estes sintomas aparecem mais cedo nos pacientes que, durante o estágio prodromico, foram sujeitos a terapia imunossupressora, tais como corticoesteróides ou antagonistas do TNF- $\beta$ , sugerindo que o tratamento possa aumentar a virulência da infecção<sup>62</sup>.

A perda de peso é considerado o sintoma mais comum dos pacientes com DW clássica, tendo sido observado em 79-92% dos doentes<sup>15</sup>. No entanto, a manifestação gastrointestinal mais frequente é a diarreia com uma incidência de cerca de 81%<sup>15</sup>. A diarreia é frequentemente do tipo esteatorreica com fezes volumosas<sup>2</sup> e quando se torna crônica pode levar a perda de peso significativa, caquexia, deficiências nutricionais e hipoalbuminemia<sup>3</sup>.

A dor abdominal é típica e pode ser acompanhada de sangramento gastrointestinal oculto ou maciço, bem como de distensão abdominal<sup>3</sup>. Hepatoesplenomegalia, ascite e edema periférico também foram reportados em cerca de 5% dos doentes<sup>15</sup>.

Esta fase também pode ser caracterizada por febre, adenopatias e anemia<sup>62</sup>. A anemia é encontrada em cerca de 80% dos casos e é causada por má absorção de vitamina B12, hemorragia intestinal e deficiências de ferro<sup>63</sup>. As adenopatias são essencialmente abdominais, com envolvimento principal dos nódulos linfáticos mesentéricos e retroperitoneais, podendo igualmente atingir nódulos periféricos. Os nódulos são facilmente palpáveis e clinicamente indistinguíveis de adenopatias devido a outras doenças infecciosas. O aumento dos nódulos linfáticos mesentéricos pode resultar na palpação de uma massa abdominal ao exame físico.<sup>2,63</sup> Granulomas de células gigantes epitelioides não caseosos, na sua maioria granulomas dos nódulos linfáticos, foram encontrados em 9% dos pacientes com DW clássica<sup>15</sup> e muitas vezes o diagnóstico de sarcoidose é considerado<sup>63</sup>.

Para além disso também pode ocorrer envolvimento cardíaco (17-55%), pulmonar (30-40%), cutâneo (40%), oftalmológico (11%) e ósseo.<sup>15,62</sup>

O envolvimento cardíaco é sob a forma de uma endocardite com envolvimento predominante da válvula aórtica e mitral<sup>65</sup>, pericardite ou miocardite. Os achados clínicos associados incluem murmúrio sistólico, atrito pericárdico, insuficiência cardíaca congestiva e alterações eletrocardiográficas inespecíficas. A alteração patológica mais frequente é a endocardite infecciosa com hemoculturas negativas, apresentando-se com válvulas mitrais ou aórticas deformadas e espessadas.<sup>63</sup> A pericardite ocorre em mais de metade das pessoas com DW, enquanto que a miocardite ocorre menos frequentemente e por vezes torna-se evidente com o surgimento de um episódio de paragem cardíaca ou morte súbita<sup>15</sup>.

O envolvimento pulmonar manifesta-se por dores torácicas, dispneia e tosse crónica devido a efusão pleural, infiltração parenquimatosa ou adenopatias mediastinais granulomatosas<sup>15,61</sup>.

As manifestações muco-cutâneas são variadas, sendo a hiperpigmentação a mais prevalente<sup>3</sup> e por vezes erroneamente diagnosticada como doença de Addison<sup>63</sup>. Exantema vasculítico, ictiose e gengivite hemorrágica são outras manifestações raramente observadas<sup>3</sup>. O melanoderma constituía uma descoberta clássica que agora raramente se observa, uma vez que a DW é geralmente reconhecida previamente ao seu aparecimento<sup>15</sup>.

As manifestações oculares incluem visão turva ou perda de visão<sup>66</sup>, sendo os achados mais frequentes a uveíte, vitreíte e corioretinite. As uveítes são habitualmente crónicas, bilaterais, anteriores ou posteriores.<sup>15</sup> As uveítes podem ser inaugurais e revelar a doença, podendo ocorrer isoladamente sem qualquer sinal digestivo associado<sup>66</sup>.

Outras manifestações como hipotiroidismo, epididimite, orquite ou envolvimento renal foram ocasionalmente observadas<sup>15,61</sup>.

### Fase neurológica

Esta fase surge quando o diagnóstico da DW não é feito durante as fases anteriores, sendo certamente a fase mais grave e responsável pela mortalidade da doença<sup>62</sup>, reportada em 6-63% dos doentes<sup>15</sup>. Pode resultar em dano irreversível que pode persistir apesar de tratamento adequado<sup>22</sup>.

O envolvimento neurológico sintomático ocorre em 10-40% dos pacientes, podendo ocorrer uma variedade de sintomas neurológicos<sup>62</sup>. As manifestações neurológicas mais frequentes são alterações cognitivas, alteração do estado de consciência, sintomas psiquiátricos, alterações dos movimentos oculares, alterações do movimento (mioclonias) e envolvimento do hipotálamo (polidipsia, hiperfagia, perda da libido e alterações no ciclo sono-vigília)<sup>61,63</sup>.

As alterações cognitivas são inespecíficas e resumem-se a declínio cognitivo, síndrome confusional, alterações do comportamento e perda de memória que se podem estender até demência<sup>67</sup>. São consideradas as mais frequentes das manifestações neurológicas (71%)<sup>15,67</sup>.

Os sintomas psiquiátricos como depressão e alteração da personalidade são observados em cerca de metade dos pacientes<sup>15</sup>.

As alterações dos movimentos oculares caracterizam-se por uma oftalmoplegia que é quase sempre do tipo supranuclear, inicialmente com envolvimento dos movimentos verticais em detrimento dos horizontais<sup>67</sup> e que acometem também metade dos pacientes<sup>15</sup>. Dentro das

alterações do movimento, para além das mioclonias (1/4 dos pacientes), existem duas que são consideradas patognomónicas da DW, embora raramente observadas (20%): a mioarritmia oculomastigatória (MOM) e a mioarritmia oculofacioesquelética (MOE). A MOM caracteriza-se por oscilações pendulares convergentes-divergentes dos olhos, síncronas com a contração involuntária rítmica dos músculos da mastigação, num ritmo de uma por segundo. A MOE trata-se do mesmo tipo de movimentos sincronizados, mas por parte dos músculos da face e dos membros e de forma mais difusa.

A tríade composta por demência, oftalmoplegia e mioclonias está presente em 10% dos doentes, sendo muito sugestiva de DW.<sup>67</sup>

Ocasionalmente, os sintomas neurológicos são os primeiros a aparecer<sup>67</sup> e o envolvimento assintomático do SNC ocorre em cerca de 50% dos casos<sup>22</sup>. Epilepsia, lesões cerebrais focais, convulsões e meningite podem também estar presentes. Cefaleia é um sintoma comum. Nalguns casos a medula espinhal ou os nervos periféricos podem estar envolvidos. Recentemente, a ataxia cerebelar tem sido reportada como sendo cada vez mais comum.<sup>22,67</sup>

Tabela 4- Principais manifestações clínicas da DW clássica. (Adaptado de Fenollar *et al*<sup>15</sup> e Schneider *et al*<sup>23</sup>)

<b>Doença de Whipple clássica</b>	
<u>Manifestações clínicas</u>	<u>Frequência de ocorrência (%)</u>
<b>Fase prodrómica</b>	
Sintomas articulares	65-90
<b>Fase gastrointestinal/sistémica</b>	
Diarreia	81
Perda de peso	79-92
Febre	35
Dor abdominal	45
Anemia	80
Adenopatias	55
Manifestações cardíacas	17-55
Manifestações pulmonares	30-40
Manifestações cutâneas	40
Manifestações oftalmológicas	11

<u>Manifestações clínicas</u>	<u>Frequência de ocorrência (%)</u>
<b>Fase neurológica</b>	<b>6-63</b>
Alterações cognitivas	71
Alteração do estado de consciência	50
Sintomas psiquiátricos	44
Manifestações hipotalâmicas	31
Oftalmoplegia supranuclear	51
Mioclonias	25
MOM e MOE	20

### 3.5.1.2 Doença de Whipple localizada

#### Endocardite associada ao *T. whipplei*

Para além do envolvimento cardíaco na DW clássica, foi descrita uma entidade clínica distinta da doença, caracterizada por endocardite infecciosa mantida pelo *T. whipplei* com hemocultura negativa<sup>68</sup>. Trata-se da segunda manifestação crónica mais frequente devido ao *T. whipplei*<sup>61</sup>. Artralgia ou artrite frequentemente precedem o diagnóstico de endocardite, constituindo os únicos sintomas extracardíacos, no entanto são raros os sinais clínicos sugestivos de infeção. Assim, a apresentação clínica desta entidade corresponde a envolvimento cardiovascular com principalmente falha cardíaca devido a insuficiência da válvula aórtica ou mitral, ocorrendo sem febre ou doença valvular prévia.<sup>61</sup> Os critérios de Duke que são usados para diagnosticar endocardite, neste contexto não são úteis, dado que dois dos critérios -febre e história de valvulopatia- estão ausentes, tornando difícil diagnosticar a endocardite associada ao *T. whipplei*<sup>15</sup>. Assim, o diagnóstico é ainda um desafio, atualmente feito através das válvulas cardíacas obtidas cirurgicamente<sup>61</sup>. Geißdorfer *et al*, após estudo de 255 pacientes com diagnóstico de endocardite bacteriana, concluíram que o *T. whipplei* é o 4º patógeno mais comum a causar endocardite infecciosa e o agente bacteriano mais comum na endocardite com cultura negativa<sup>68</sup>.

#### Doença de Whipple neurológica isolada

As manifestações neurológicas ocorrem em 3 situações:

- Recaída neurológica de DW previamente tratada como resultado de uso de antibióticos que dificilmente atravessam a barreira hematoencefálica (BHE).
- Envolvimento neurológico na DW clássica.
- Sintomas neurológicos isolados devido ao *T. whipplei* sem evidência histológica de envolvimento intestinal.<sup>15</sup>

Esta é uma forma de atingimento neurológico isolado sem envolvimento sistémico<sup>15,22,69</sup>. O estudo feito por Panegyres *et al*<sup>69</sup> revelou que esta condição é extremamente rara, mais prevalente no género masculino, acometendo tanto crianças como adultos. Trata-se de uma condição que afeta 5% dos doentes<sup>67</sup>.

Os pacientes afetados por esta entidade clínica podem apresentar dois síndromes diferentes: tipo 1 e tipo 2.

O tipo 1 é caracterizado pela presença de múltiplas lesões cerebrais que se associam a múltiplos sinais e sintomas neurológicos.

O tipo 2, pelo contrário, é caracterizado por uma única lesão focal que produz efeito de massa. Em termos clínicos, os pacientes apresentam défices neurológicos devido à localização da massa intracraniana e à hipertensão intracraniana com sintomas inespecíficos.<sup>69</sup>

De um ponto de vista clínico, é impossível distinguir entre a DW neurológica isolada e o envolvimento neurológico associado à DW clássica<sup>62</sup>.

### Outras manifestações localizadas isoladas

#### a) Uveíte

Tal como referido anteriormente relativamente às manifestações oculares da DW clássica, as uveítes podem ocorrer isoladamente sem evidência clínica de doença gastrointestinal. Os sinais oftalmológicos vão desde precipitados corneanos endoteliais, nódulos na íris, exsudação da pars plana, precipitados nodulares na retina e neovascularização. Este tipo de apresentação atípica e precoce da DW extraintestinal pode ser confundido com sarcoidose.<sup>66</sup>

#### b) Envolvimento osteoarticular

Por vezes o diagnóstico de DW pode ser estabelecido em pacientes com artrite ou espondilodiscite sem a presença de sintomas intestinais clássicos. Assim, para pacientes de meia-idade que se apresentam com episódios intermitentes de oligo ou poliartrite das grandes articulações com fator reumatoide (FR) negativo e que são resistentes ao tratamento com AINES, corticoesteróides, analgésicos e outros fármacos antirreumáticos, deve ser considerada a hipótese de se tratar de DW.<sup>22</sup>

#### c) Envolvimento pulmonar

Caracteriza-se por manifestações clínicas pulmonares como tosse crónica não produtiva, dor torácica pleurítica e dispneia associadas a achados radiológicos de efusão pleural ou infiltrados pulmonares. No entanto, estes sinais e sintomas não são acompanhados de manifestações intestinais, o que torna difícil distinguir a DW da sarcoidose, que se trata de um distúrbio granulomatoso que associa manifestações pulmonares com outros sintomas inespecíficos como fadiga, febre, anorexia e perda de peso.<sup>61,63</sup>

### 3.5.2. Infecção aguda

#### 3.5.2.1 *T.whipplei* como agente de gastroenterite

O *T.whipplei* foi associado a gastroenterite moderada em crianças, com elevada carga bacteriana nas fezes, afetando 15% das crianças estudadas com idades entre os dos 2-4 anos<sup>36</sup>. Quando os pacientes recuperaram da diarreia, o *T.whipplei* não foi mais detetado nas fezes, o que sugeriu que o *T.whipplei* possa ser um agente da diarreia. Al Moussawi *et al*<sup>61</sup> desenvolveram um modelo animal que demonstrou que ratos infetados oralmente desenvolviam um episódio diarreico, com uma excreção transitória da bactéria nas fezes. No entanto, não foi detetada invasão tecidual, mas sim uma associação com outros patógenos entéricos, o que levantou a hipótese de que talvez o facto de existir dano prévio da mucosa possa favorecer a invasão dos tecidos e a resposta imunitária. Estes estudos sugeriram que durante a infância, a primo-infecção pelo *T.whipplei* pode resultar numa imunidade protetora, já que 50% da população adulta geral tem anticorpos específicos para a bactéria e a maioria dos portadores saudáveis não têm episódios de diarreia<sup>36,61</sup>.

#### 3.5.2.2 *T.whipplei* como agente de pneumonia

Bousbia *et al*<sup>70</sup> mostraram que o *T.whipplei* pode ser um potencial agente infeccioso para pacientes admitidos na unidade de cuidados intensivos, podendo ser encontrado em amostras de lavado bronco-alveolar. Assim, identificaram a bactéria como estando associada à ocorrência de pneumonia em pacientes com ventilação mecânica. A ausência de anticorpos para a bactéria nestes pacientes aponta para uma infecção recente em pessoas não imunes. No entanto, na maioria dos pacientes estudados foram igualmente identificadas bactérias da flora oral, o que sugeriu que o *T.whipplei* possa contribuir para a ocorrência de pneumonia de aspiração juntamente com as bactérias presentes na cavidade oral. Como tal, ainda não foi possível concluir que o *T.whipplei* é isoladamente um agente etiológico da pneumonia, apesar de já existir algumas evidências.<sup>70</sup>

### 3.5.3. Colonização assintomática

Tal como fora supra-citado na secção 3.2 e 3.3, o *T.whipplei* pode ser encontrado nas fezes, saliva, suco gástrico e em amostras de biópsia duodenal de indivíduos sem qualquer sinal de DW. Assim se comprovou a existência de portadores assintomáticos crónicos.<sup>25,29,30</sup>

Em populações de alto risco, a prevalência de *T.whipplei* é aumentada, nomeadamente nos trabalhadores de estações de tratamento de águas residuais e nas crianças do meio rural do Senegal<sup>24,37</sup>.

No entanto, a carga de *T. whipplei* na saliva ou fezes de portadores saudáveis é sempre mais baixa do que aquela observada em pacientes com DW sintomática<sup>25</sup>.

O facto desta bactéria ser comum em amostras de fezes e saliva<sup>25,30</sup>, ter sido detetada em esgotos, com alta prevalência em trabalhadores de estações de tratamento de águas residuais<sup>24</sup>, de ter uma prevalência de 44% nas fezes das crianças saudáveis dos 2-10 anos no Senegal<sup>37</sup> e de estar associado a uma percentagem significativa de gastroenterite em crianças<sup>36</sup>, indica que o *T. whipplei*, considerado uma bactéria rara, se trata de uma bactéria intestinal comum.

### Secção 3.6. Abordagem diagnóstica

Dado o grande espectro de manifestações clínicas inespecíficas inerentes à DW, o diagnóstico é feito muitas vezes tardiamente<sup>23</sup>.

Inicialmente, deve-se começar pela história clínica, desde a vertente social e ambiental até às manifestações clínicas que possam sugerir DW, acompanhado de exame físico. No estágio prodromico da DW clássica o diagnóstico pode ser difícil, dada a ausência de sintomas gastrointestinais.

Seguidamente, deve ser seguido um determinado algoritmo de avaliações diagnósticas de modo a identificar a presença da doença. Moos *et al*<sup>23</sup>, em 2011, elaboraram um esquema representativo do mesmo. (Figura 4).

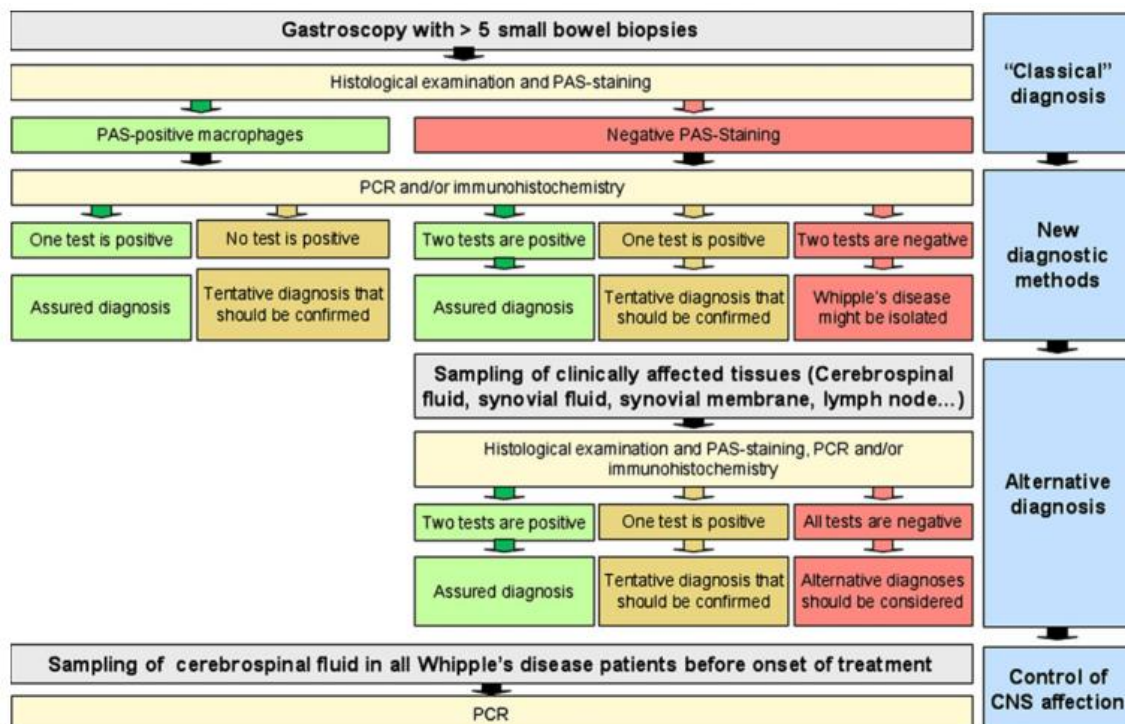


Figura 4- Esquema hierárquico para o diagnóstico de DW. (Fonte: Moos *et al*<sup>23</sup>)

### 3.6.1. Endoscopia e análise histológica com coloração de PAS

O método standard e de primeira escolha para o diagnóstico é a endoscopia digestiva alta (EDA), com biópsia e análise histológica com coloração de PAS<sup>23,71</sup>.

Os achados endoscópicos mais frequentes são o espessamento das pregas da mucosa, com exsudados esbranquiçados confluentes, representando deposição lipídica na mucosa, alternando com erosões e áreas de friabilidade da mucosa<sup>2,28</sup>. (Figura 5a)

Deve-se proceder à colheita de pelo menos cinco biópsias ao longo da mucosa duodenal proximal e distal do jejuno proximal, mesmo na ausência de sintomas gastrointestinais<sup>71</sup>.

O achado histológico clássico da doença é a presença de macrófagos espumosos na lâmina própria, que contêm uma grande quantidade de inclusões PAS positivas, ou seja que reagem e aparecem na cor magenta, e diastase resistentes. Estas inclusões correspondem a restos de bactérias fagocitadas, podendo também observar-se vasos linfáticos dilatados.<sup>23</sup> (Figura 5b)

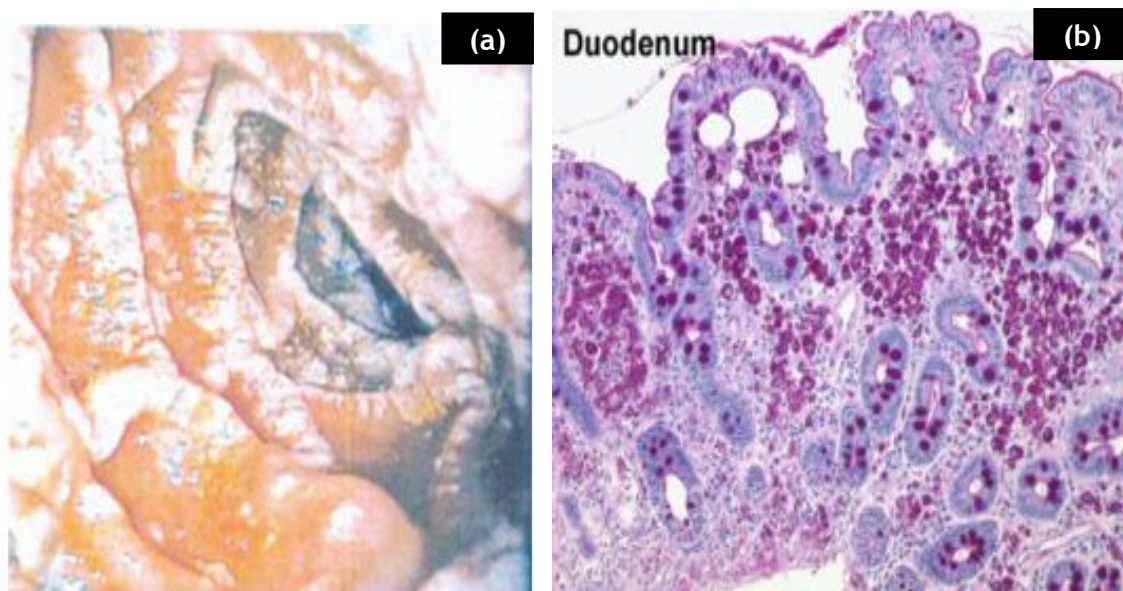


Figura 5- EDA (a) e biópsia duodenal (b). (a) Mucosa duodenal na DW clássica vista por EDA. Fonte: Oliveira *et al*<sup>2</sup>. (b) Análise histológica com coloração PAS de uma biópsia duodenal com numerosos macrófagos corados que indicam a presença de *T. whipplei*. (Fonte: Moos *et al*<sup>23</sup>)

No entanto, em pacientes sem manifestações gastrointestinais, a coloração de PAS das biópsias duodenais podem ser negativas e deve-se obter amostras de locais clinicamente afetados, tais como no líquido cefalorraquidiano (LCR) , cérebro, nódulos linfáticos, líquido sinovial, válvulas cardíacas, pele, humor aquoso ocular, entre outros<sup>22</sup>. (Figura 6)

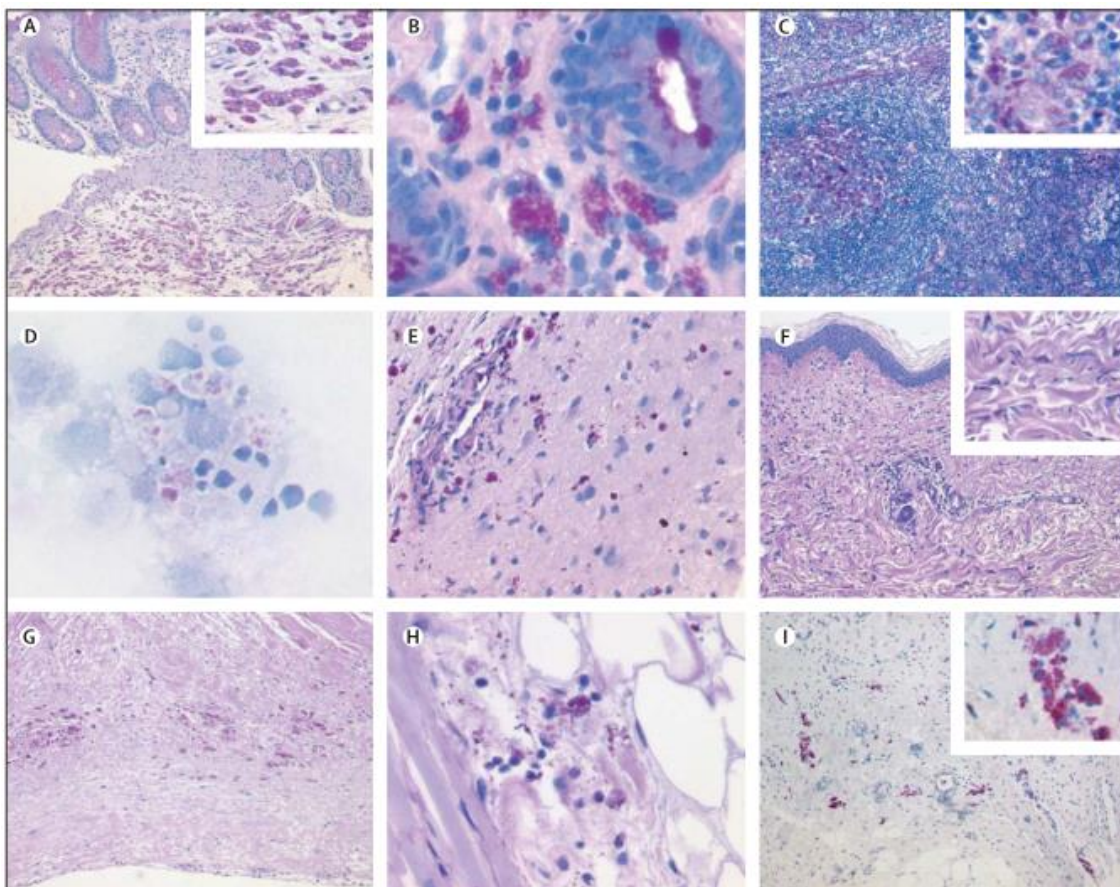


Figura 6- Detecção PAS de macrófagos em diferentes locais na DW. (A) Cólon. (B) Estômago. (C) Nódulo linfático. (D) LCR. (E) Cérebro. (F) Pele. (G) Válvula cardíaca. (H) Miocárdio e epicárdio. (I) Membrana sinovial. (Fonte: Schneider *et al*<sup>22</sup>)

Para além disso, a doença pode estar confinada à submucosa ou estar numa fase inicial de doença e daí resultarem em biópsias normais. Ainda assim, as amostras dos locais extra-intestinais podem negatizar com a coloração de PAS.<sup>2</sup>

Para além de ser uma boa ferramenta diagnóstica, a coloração de PAS também permite avaliar o sucesso da terapêutica<sup>71</sup>.

### 3.6.2. Polymerase chain-reaction (PCR)

A sequenciação do genoma do *T.whipplei* permitiu a recorrência à técnica da PCR com uma significativa sensibilidade e especificidade, tornando-a um importante método de diagnóstico, de forma a detetar a bactéria em tecidos e fluidos orgânicos. No entanto, a realização desta técnica deve ser limitada a laboratórios acreditados.<sup>5,72</sup>

Várias sequências genéticas estão atualmente disponíveis baseados no 16S rRNA, 23S rRNA e RpoB<sup>14</sup>.

Esta técnica já foi adaptada para a PCR quantitativa (qPCR) que beneficia da identificação e quantificação por fluorescência e de tempos de deteção mais curtos, baseada em dois conjuntos de *primers* obtidos de dois genes diferentes. Deste modo, permite diferenciar entre contaminação ambiental e concentrações elevadas de bactéria, evitando falsos positivos.<sup>73</sup>

A extração do DNA é um passo crucial no procedimento e vários protocolos propuseram o uso de tecidos embebidos em parafina, nomeadamente num estudo feito em 2013, dado que são equiparáveis a amostras frescas<sup>14,74</sup>.

A PCR é importante para confirmar o diagnóstico dos achados PAS positivos. Esta confirmação é importante porque a presença de macrófagos com material PAS positivo não é patognomónico desta doença.<sup>3</sup>

Devido ao facto do SNC poder estar envolvido na doença de forma assintomática em 50% dos casos, é importante fazer uma PCR do LCR em qualquer caso antes de iniciar tratamento<sup>23</sup>. Neste caso, a coloração de PAS requer biópsia cerebral, um procedimento invasivo, enquanto que a PCR só necessita do LCR.

A PCR dos tecidos afetados também é aconselhado realizar-se como diagnóstico juntamente com a coloração de PAS, bem como para controlo da terapia, dado que esta se pode tornar negativa durante o tratamento<sup>23</sup>.

Como triagem não invasiva aquando da suspeita de DW clássica, Fenollar *et al*<sup>72</sup> sugeriram a realização uma qPCR específica para o *T.whipplei* em amostras de saliva e fezes. Quando ambos os testes são positivos, o diagnóstico é altamente provável e o contrário acontece quando ambos são negativos. Em 2012, os mesmos autores<sup>75</sup> propuseram um novo algoritmo de diagnóstico baseado nestes testes de triagem. (Figura 7)

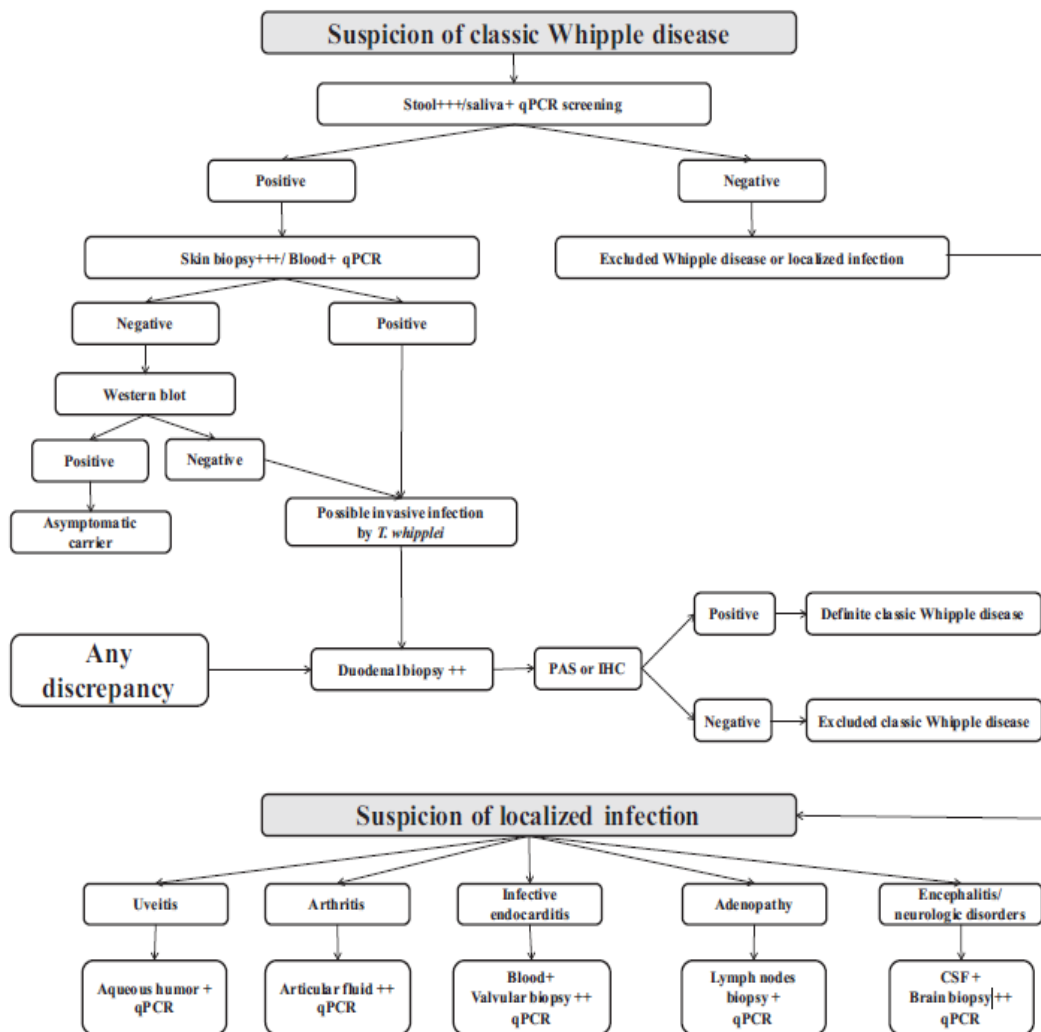


Figura 7- Estratégia diagnóstica para a DW usando técnicas de qPCR. Quando a qPCR positiva nas fezes e saliva, o diagnóstico deve ser completado com qPCR em amostras mais invasivas, como o sangue, pele, ou outros tecidos de acordo com a clínica. Biópsias duodenais devem ser usadas para completar o diagnóstico usando análise imunohistoquímica ou coloração PAS. (Fonte: Fenollar *et al*<sup>75</sup>)

### Limitações ao uso da PCR

Dado que existem portadores assintomáticos do *T.whipplei*, a PCR convencional pode positivar apesar de se tratar apenas de uma colonização intestinal pela bactéria. Logo, uma PCR positiva das amostras gastrointestinais tem de ser confirmada por histologia ou por uma segunda PCR de amostras estéreis (ex.: LCR ou líquido sinovial) ou pela técnica mais recente de PCR quantitativa, de forma a evitar mascarar outros diagnósticos diferenciais.<sup>23,73</sup>

Existe igualmente o problema dos falsos negativos atribuíveis à presença de inibidores ou baixa carga bacteriana na amostra. Neste caso, ou todos os testes PCR são negativos ou apenas um é positivo, podendo levar a descartar o diagnóstico com conseqüente morte do paciente.<sup>72</sup>

Para além disso, os sistemas de PCR podem positivar devido a remanescentes de bactéria morta mesmo após tratamento bem sucedido<sup>76</sup>.

### 3.6.3. Microscopia eletrónica

Teve um contributo importante na deteção do bacilo em 1961, tendo sido considerada o exame “gold-standard” para a confirmação diagnóstica, ao detetar a parede celular trilaminar do *T.whipplei*<sup>63</sup>. (Figura 8)

Atualmente, foi substituída pela PCR, sendo apenas usada para esclarecer casos duvidosos<sup>63</sup>.

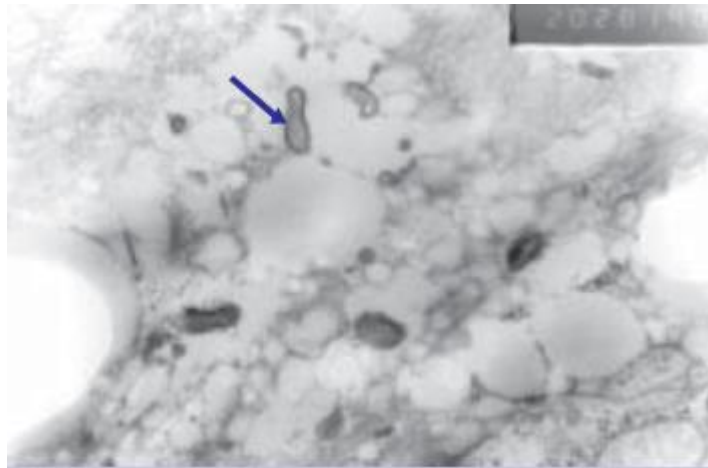


Figura 8- Microscopia eletrónica. A seta indica o bacilo de Whipple. (Fonte: Carneiro *et al*<sup>18</sup>)

### 3.6.4. Imunohistoquímica

Método com boa sensibilidade que permite a identificação do *T.whipplei* nos tecidos e fluidos orgânicos PAS negativos e em monócitos circulantes do sangue periférico, a partir de anticorpos específicos contra a bactéria. Dado que a coloração de PAS de biópsias de SNC pode ser inespecífica e mal interpretada como inclusões de *T.whipplei*, a imunohistoquímica adicional pode ser uma avaliação importante.<sup>77</sup>

### 3.6.5. Cultura

A cultura da bactéria é limitada a laboratórios especializados em investigação e demora vários meses a ser obtida, logo atualmente não é uma ferramenta diagnóstica de rotina, embora possa ser útil para testar a suscetibilidade antibiótica ou a viabilidade da bactéria em certos casos<sup>6,7,22,23,42,43</sup>.

### 3.6.6. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

FISH combina detecção molecular com visualização e daí ser usada para detecção e identificação direta da bactéria no seu contexto histológico, permitindo diferenciar entre contaminação de verdadeira infecção.

Uma vez que as sondas hibridizam o rRNA presente primariamente nas bactérias metabolicamente ativas, é altamente provável que bactérias FISH positivas sejam viáveis na altura da amostra. No entanto, não se trata de um método de rotina dado a limitada disponibilidade.<sup>76</sup>

### 3.6.7. Serologia

Atualmente, já foram identificados vários antigénios e anticorpos específicos do *T.whipplei*. No entanto, é considerado um método de baixa sensibilidade e especificidade. O diagnóstico serológico só deve ser aplicado em combinação com uma PCR positiva, dado que os anticorpos podem ser detetados em indivíduos sem a doença.<sup>7,22,23</sup>

### 3.6.8. Análises laboratoriais

São inespecíficas e vão desde anemia hipocrómica microcítica, linfocitopenia, trombocitose, eosinofilia, VS elevada, aumentos das proteínas de fase aguda, ferropenia até alterações das provas hepáticas e hidroeletrólíticas. Podem evidenciar sinais de má-absorção e enteropatia perdedora de proteínas, como baixa concentração de β caroteno, deficiência de vitaminas, hipoalbuminémia e hipercolesterolemia. A excreção de gordura nas fezes pode estar aumentada, com baixa absorção da D-xilose.<sup>14</sup>

O LCR pode ser normal ou apresentar pleocitose e aumento das proteínas, sem hipoglicorráquia.<sup>2</sup>

### 3.6.9. Exames imagiológicos

#### a) Radiografia contrastada do intestino delgado

Exame que revela alterações inespecíficas da morfologia do intestino, nomeadamente espessamento das pregas do duodeno e jejuno, que são comuns nas síndromes de má absorção, ou hepatoesplenomegalia<sup>2,14</sup>.

#### b) Ecografia abdominal e Tomografia computadorizada (TC)

Permitem observar um aumento nos nódulos linfáticos mesentéricos e/ou retroperitoneais<sup>2</sup>.

### c) TC e Ressonância Magnética cerebral

Podem-se mostrar normais ou permitir identificar um padrão de atrofia cerebral, lesões a ocupar espaço com captação de contraste, lesões na substância branca ou hidrocefalia<sup>67</sup>.

#### 3.6.10. Casos específicos

No caso da endocardite de hemocultura negativa, o diagnóstico é feito através da extração cirúrgica da válvula envolvida, com posterior análise histológica, PCR e porventura exame cultural<sup>65</sup>.

Para a DW do SNC, Louis *et al* propuseram critérios de diagnóstico em que pelo menos uma destas alterações é necessário estar presente para realizar um diagnóstico definitivo: MOM ou MOE, biópsia positiva e/ou PCR positiva. Para se considerar como diagnóstico possível é necessário pelo menos um destes sintomas sistêmicos: febre de origem indeterminada, sintomas gastrointestinais, artralguas ou adenopatias associadas a pelo menos um sinal neurológico.<sup>16</sup> No entanto, apesar destas recomendações, 5% dos pacientes com envolvimento do SNC não têm sintomas sistêmicos<sup>67</sup>. Quando o resultado da PCR do LCR é negativa mas é observada uma lesão cerebral na RM ou TC, deve-se realizar uma biópsia cerebral para PCR e imunohistoquímica<sup>72</sup>.

O diagnóstico de uveíte é difícil, dado que a quantidade de amostra de humor aquoso é baixa e os exames carecem de sensibilidade<sup>72</sup>.

Apesar da aparente raridade da doença, o facto da DW poder ocorrer na ausência de manifestações intestinais clássicas, enfatiza a importância de considerar o diagnóstico em pacientes com apresentações atípicas. A DW deve ser certamente suspeitada no caso de doentes com quadro de perda de peso, diarreia, artralguas e dor abdominal ou febre, sendo nesses casos indicada uma EDA com biópsia. No entanto, há outros cenários clínicos em que a DW ocorre e que podem ser subdiagnosticados. Por exemplo, demência sem causa aparente, dor torácica e tosse crónica com infiltrados pulmonares que simulam sarcoidose, nódulos linfáticos periféricos e intra-abdominais hipodensos na TC, bem como hiperpigmentação cutânea sem relação com disfunção adrenérgica.<sup>78</sup>

## **Secção 3.7. Diagnóstico Diferencial**

Com base na clínica e características endoscópicas e imagiológicas, o espectro de patologias com o qual a DW faz diagnóstico diferencial é bastante vasto. (Tabela 5) A presença de células com material PAS positivo pode ser causada por outros agentes infecciosos, tais como

*Mycobacterium avium complex*, *Rhodococcus*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium*, e certos fungos como o *Histoplasma*. A coloração Ziehl-Neelsen é útil para diferenciar as infeções provocadas por bacilos álcool-ácido resistentes.<sup>2,61</sup> A doença inflamatória intestinal (DII) e outras síndromes de má absorção como a doença celíaca e giardíase, bem como a maior parte das vasculites com atingimento gastrointestinal podem mimetizar a DW, cursando com perturbações da função intestinal e da integridade da mucosa<sup>2,15,27</sup>. A presença de granulomas nos achados histológicos impõe a sarcoidose e a tuberculose intestinal como diagnóstico diferencial, para além de que também se podem associar a manifestações pulmonares com outros sintomas inespecíficos<sup>19-21</sup>. A presença de adenopatias retroperitoneais e mesentéricas juntamente com febre e sintomas gastrointestinais, pode estar associada a linfomas malignos<sup>3,20,21,63</sup>.

Tanto a sarcoidose como as vasculites podem apresentar-se com perda de peso, diarreia crónica, adenopatias, artralguas migratórias e sintomas oftalmológicos como nódulos na íris e precipitados corneanos<sup>22,66</sup>. Outras patologias a ser consideradas são doenças reumáticas inflamatórias, como a artrite reumatóide seronegativa, caso se verifique uma poliartrite seronegativa crónica destrutiva<sup>15</sup>, e doença de Still em caso de febre e poliartralguas migratórias<sup>20</sup>. Para além disso, também se pode considerar as infeções víricas como pelo HIV<sup>18</sup>, as doenças cerebrovasculares, endocardites bacterianas de hemocultura negativa distintas da provocada pelo *T.whipplei* e doenças que causam hiperpigmentação cutânea, como a doença de Addison<sup>15,63,65</sup>. O leque de diagnósticos diferenciais em doentes com quadros clínicos exclusivamente neurológicos (Tabela 5), faz com que o rastreio da DW seja importante, dado que se trata de uma doença potencialmente tratável e cujo atraso no tratamento pode resultar em lesões cerebrais irreversíveis<sup>16</sup>.

Tabela 5: Principais patologias que fazem diagnóstico diferencial com a DW.

<b>Diagnóstico Diferencial</b>	
<b>Infeções intestinais</b>	<b>Infeção pelo HIV</b>
<i>Mycobacterium avium complex</i>	<b>Endocardite bacteriana</b>
<i>Rhodococcus</i>	<i>Bartonella</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
<i>Corynebacterium</i>	<b>Doenças reumáticas inflamatórias</b>
Fungos	<b>Doença de Addison</b>
<i>Giardia lamblia</i>	<b>Doenças cerebrovasculares</b>
<b>DII</b>	Encefalites
<b>Doença celíaca</b>	Doenças desmielinizantes
<b>Vasculites</b>	Vasculites do SNC
<b>Sarcoidose</b>	Infeções crónicas do SNC (Tuberculose, HIV)
<b>Tuberculose intestinal</b>	Doença de Alzheimer
<b>Linfomas malignos</b>	Doença de Creutzfeldt-Jakob

## Secção 3.8. Abordagem Terapêutica

### 3.8.1. Antibioterapia

O primeiro relato de tratamento eficaz da DW data dos anos 50 com recurso ao cloranfenicol, sendo até à altura considerada fatal<sup>23,62,79</sup>. No entanto, esta terapia acarreta efeitos secundários graves<sup>2</sup>.

Em 1966, foi proposta uma terapia com estreptomicina e penicilina intravenosas durante duas semanas, seguida de tetraciclina oral durante 3-12 meses. A partir daí, as tetraciclinas passaram a ser o tratamento de escolha para terapia de longa duração<sup>79</sup>. No entanto, em 1985, um estudo revelou que a frequência de recidivas principalmente neurológicas após este regime terapêutico era alta (cerca de 35%)<sup>22</sup> e levou à exploração de outras alternativas, como o trimetropim-sulfametoxazol (TMP-SMX) que atravessa melhor a BHE do que as tetraciclinas<sup>22,61,79</sup>. De facto, melhores resultados foram obtidos na década de 90, nomeadamente num estudo não-aleatório parcialmente retrospectivo<sup>80</sup> em 30 pacientes que provou que o tratamento com TMP-SMX era superior às tetraciclinas na remissão clínica da doença do SNC. No entanto, também permitiu constatar que o TMP-SMX não prevenia recidivas neurológicas em todos os casos. Este foi considerado o primeiro estudo feito de comparação entre regimes terapêuticos usados na DW.

A partir daí, o tratamento mais utilizado passou a ser a administração oral de trimetropim (160 mg) e sulfametoxazol (800 mg) duas vezes por dia, durante um a dois anos. No caso de recidiva ou intolerância ao TMP-SMX, pode usar-se o cefixime (400 mg oral duas vezes por dia) ou a doxiciclina (100 mg duas vezes por dia). Esse regime deve ser precedido de uma terapia de indução com altas doses de estreptomicina (1g por dia) juntamente com penicilina G (1,2 milhões de unidades por dia), administrados por via parenteral, ou ceftriaxone IV (2g por dia) durante duas semanas. A terapia de indução é principalmente indicada nos doentes mais graves ou com envolvimento do SNC, uma vez que são usados antibióticos que atingem altas concentrações na BHE. No entanto, têm sido reportadas falhas na resposta clínica e recorrências.<sup>2,14,20-22,61,79</sup>

Graças aos avanços na cultura do *T.whipplei*, sequenciação genómica e testes de suscetibilidade foram feitos desde 2000<sup>7,10,11,81,82</sup>. No meio axénico, vários antibióticos revelaram-se ativos, desde a penicilina G, amoxicilina, gentamicina, levofloxacina e ceftriaxone. Por outro lado, em meio celular apenas a doxiciclina e os macrólidos se mostraram ativos, ao contrário das cefalosporinas e das fluoroquinolonas. A suscetibilidade ao imipenem é variável.<sup>81,82</sup> A análise genómica mostrou que o *T.whipplei* carece de uma sequência codificadora para a dihidrofolato redutase, o alvo do trimetropim. Testes in vitro

confirmaram que a trimetropina não é tão ativa como era prevista, enquanto que os compostos de sulfonamida como o sulfametoxazol e a sulfadiazina são ativos.<sup>81,82</sup> Assim, os testes *in vitro* demonstraram que o esquema recomendado seria monoterapia com compostos de sulfonamida, em detrimento do TMP-SMX.

No entanto, em 2009, Fenollar *et al*<sup>83</sup> descreveram várias mutações no gene alvo do sulfametoxazol (folP), que leva a resistências *in vitro* e falha clínica secundária, sugerindo que este composto não seria ótimo para o tratamento da DW. Os autores sugerem a amplificação e sequenciação do gene folP por PCR para detetar a presença de mutações e permitir a deteção precoce do risco de desenvolver resistência às sulfonamidas.<sup>83</sup> Assim, alternativas ao TMP-SMX ou ao SMX isolado poderão ser úteis<sup>23</sup>.

De facto, baseado na observação de que a acidificação dos vacúolos é crucial para a sobrevivência do *T.whipplei* nos fagossomas<sup>84</sup>, Bousbia *et al*<sup>81</sup> testaram *in vitro* a suscetibilidade do *T.whipplei* à doxiciclina em combinação com a hidroxicloroquina, um agente alcalinizante, mostrando ser o regime mais bactericida contra o *T.whipplei*, *in vitro*. No entanto a sua eficácia clínica ainda é desconhecida<sup>3</sup>. De acordo com estes dados Fenollar *et al*<sup>15</sup> e Schneider *et al*<sup>22</sup> propuseram um regime de doxiciclina (200 mg por dia) e hidroxicloroquina (200 mg 3 vezes por dia) sem terapia de indução, durante pelo menos 12 a 18 meses, para erradicar o organismo intracelular na DW sem envolvimento neurológico (ausência de sintomas e PCR do LCR negativa). Nos casos de envolvimento neurológico, foi sugerida a adição de altas doses de sulfametoxazol ou sulfadiazina ao regime, dada a baixa penetrância da doxiciclina no LCR.<sup>15</sup>

A raridade desta doença resulta em dificuldade em realizar ensaios de controlo aleatório para avaliar o melhor tratamento<sup>3</sup>. Recentemente, em 2009, um estudo na Europa central<sup>26</sup>, o primeiro estudo prospetivo realizado no âmbito da terapêutica da DW, permitiu recolher 40 pacientes e comparar a eficácia do ceftriaxone (1x2g IV/dia) vs meropenem (3x1g/IV/dia) durante 14 dias seguido de 12 meses de TMP-SMX, revelando que a eficácia em ambos os grupos de tratamento é a mesma, com um *odds ratio* de remissão em 3 anos de 0,95 (P=0,1) em comparação com uma taxa de remissão de 70-89% dos estudos retrospectivos publicados até então. Feurle *et al*<sup>26</sup>, verificaram assim igual eficácia no uso tanto do ceftriaxone ou meropenem como terapia de indução, no entanto, dado que o ceftriaxone é mais barato e requer apenas um infusão diária, sugerem o uso do mesmo e caso haja intolerância, a mudança para o meropenem. Apesar desta terapia ter obtido um efeito clínico significativo, não está claro se previne recidivas a longo prazo. Atualmente foi descrita falha e recidiva após tratamento com TMP-SMX para além de que a terapia intravenosa de indução com ceftriaxone revelou ser ineficaz na amostra estudada. Neste estudo, Lagier *et al*<sup>79</sup> recomendam o uso da terapia bactericida descrita previamente com doxiciclina e hidroxicloroquina. Discrepâncias entre estes dois estudos podem dever-se aos critérios de

cura usados, duração do seguimento ou heterogeneidade geográfica da suscetibilidade aos antibióticos.

Mais recentemente, após relato do primeiro caso de recidiva com a terapia bactericida composta por doxiciclina juntamente com hidroxicloroquina, os autores sugerem manter o mesmo esquema bactericida durante 12 meses e adicionar manutenção profilática com doxiciclina (200mg/dia) para toda a vida<sup>85</sup>.

Após poucas semanas do início da antibioterapia, observa-se uma melhoria clínica bastante marcada nos doentes com DW clássica. No entanto, não há nenhum prazo estabelecido acerca da duração do tratamento.<sup>61</sup> O que se constata é que a literatura relativamente ao tratamento da DW ainda é muito confusa e que a terapia ainda é usada de forma empírica, não havendo consenso quanto ao melhor tratamento antibiótico para a DW.

Os regimes terapêuticos usados atualmente estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6: Esquemas terapêuticos usados para a DW.

Esquemas terapêuticos		
Terapia inicial (15 dias)	Terapia de manutenção (1 a 2 anos)	
<b>1</b> Penicilina G (1,5 UM/dia IV) + Estreptomicina (1g/dia IV)	Trimetropim/Sulfametoxazol (160/800 mg oral 2x/dia)	<u>Alternativa ao TMP-SMX:</u> Cefixime (400 mg oral 2x/dia) ou Doxiciclina (100 mg oral 2x/dia)
<b>2</b> Cefalosporina 3 <sup>a</sup> geração (2g IV dia)	Trimetropim/Sulfametoxazol (160/800 mg oral 2x/dia)	
<b>3</b> Meropenem (3g/IV/dia)	Trimetropim/Sulfametoxazol (160/800 mg oral 2x/dia)	
<b>4</b> Sem terapia de indução	Doxiciclina (100 mg 2x/dia) + Hidroxicloroquina (600 mg/dia)  Se envolvimento neurológico: adicionar sulfametoxazol ou sulfadiazina em altas doses  Considerar doxiciclina como terapia profilática para toda a vida	

### 3.8.2. Terapia imunológica

Como mencionado previamente, suspeita-se que os doentes com DW tenham uma resposta reduzida na resposta Th1 que pode contribuir para o desenvolvimento da doença e provavelmente para as recidivas. Assim, recidivas podem ocorrer apesar de correta antibioterapia. Nesses casos, um suporte adicional com citocinas Th1 poderá ser útil, como o IFN- $\gamma$ .<sup>49,50,55,61</sup>

O IFN- $\gamma$  foi apenas utilizado experimentalmente em conjunto com a antibioterapia em doentes refratários aos antibióticos, resultando em alguns casos na erradicação da bactéria do aparelho gastrointestinal e do SNC<sup>55</sup>. No entanto, esta terapia só deve ser usada em pacientes com recidiva documentada e sem lesões cerebrais inflamatórias que devem ser excluídas por RM<sup>22</sup>.

## Secção 3.9. Complicações e seguimento

### 3.9.1. Complicações

Antes de se compreender a importância de usar antibioterapia que ultrapassasse a BHE, a recidiva da DW com envolvimento cerebral era a complicação mais severa responsável pelo alto grau de mortalidade desta condição<sup>15,22</sup>.

Atualmente, apesar de na maioria dos casos se verificar uma boa resposta terapêutica, é difícil reverter as alterações neurológicas, podendo algumas delas manter-se mesmo após tratamento instituído e inclusivamente resultar em danos irreversíveis ou morte<sup>14,15,67</sup>.

Nos últimos anos, constatou-se que a complicação mais importante e severa é um processo inflamatório inespecífico definido como síndrome inflamatório de reconstituição imune (SIRI). Este síndrome ocorre em cerca de 10% dos doentes após início do tratamento e consiste no aparecimento de febre e outros processos inflamatórios como artrite, podendo apenas nesta fase se tornar aparente o envolvimento extraintestinal.<sup>86,87</sup> Os pacientes de mais alto risco são aqueles que foram tratados com terapia imunossupressora antes do correto diagnóstico de DW<sup>87</sup>. Apesar do tratamento ainda não ter sido avaliado prospectivamente, estes pacientes costumam responder favoravelmente ao tratamento adicional com corticoesteróides (prednisolona 1,5 mg/kg/dia)<sup>86,87</sup>. O prognóstico é bom se a doença for tratada atempadamente. Em casos de doença recidivante apesar da antibioterapia adequada, regimes terapêuticos alternativos devem ser considerados (ex.: IFN- $\gamma$ )<sup>55</sup>.

### 3.9.2. Seguimento

As recidivas da DW são frequentes e podem ocorrer vários anos após o diagnóstico, sendo o SNC um dos locais preferenciais<sup>2,14,28</sup>.

Os esquemas cronológicos de monitorização dos doentes sugeridos por alguns autores estão representados na tabela 7.

Tabela 7: Esquemas cronológicos de seguimento dos doentes.

Seguimento	
Autores	Esquemas
Flemmer <i>et al</i> (2000) <sup>28</sup>	Até 10 anos após diagnóstico
Marth <i>et al</i> (2003) <sup>14</sup> Afshar <i>et al</i> (2010) <sup>3</sup>	6 e 12 meses de tratamento, se boa resposta clínica
Scneider <i>et al</i> (2008) <sup>22</sup>	6 e 12 meses de tratamento > anualmente
Lagier <i>et al</i> (2010) <sup>79</sup>	6 em 6 meses durante toda a vida
Moos <i>et al</i> (2011) <sup>23</sup> Biagi <i>et al</i> (2012) <sup>62</sup>	6 e 12 meses de tratamento > anualmente nos primeiros 3 anos > 3 em 3 anos para toda a vida

Relativamente ao modo como esse seguimento deve ser feito, pode ser através da análise histológica, PCR ou microscopia eletrónica.

Alguns autores sugerem que as lesões intestinais podem ser seguidas através de biópsias duodenais através da mudança de aspeto da mucosa caracterizada pela reconstituição gradual da arquitetura vilosa do intestino delgado e desaparecimento das inclusões granulares, quando o tratamento é eficaz, bem como pela coloração de PAS. (Figura 9) No entanto, a presença de macrófagos PAS positivos na lâmina própria pode manter-se por múltiplos anos após a remissão clínica, devido à presença de material bacteriano degradado, resultando em falsos positivos.<sup>14,18,26,62,71</sup>

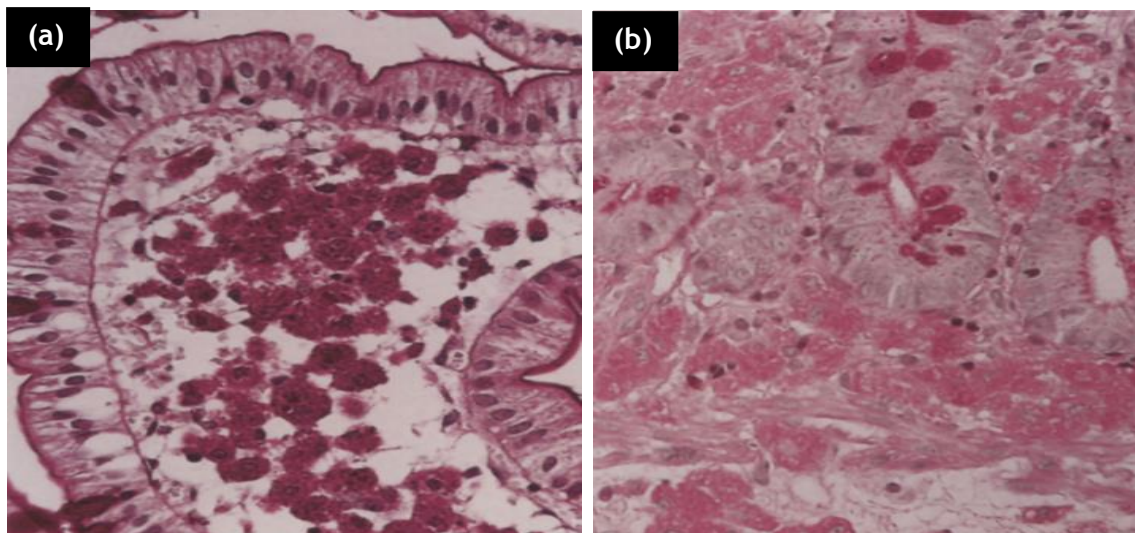


Figura 9: Biópsia duodenal de um paciente com DW ao diagnóstico(a) e após tratamento(b). (a): Macrófagos com citoplasma com inclusões granulares intensamente PAS positivas. (b): Os macrófagos não têm inclusões granulares, apesar de um citoplasma fracamente PAS positivo. (Fonte: von Herbay *et al*<sup>71</sup>)

Outros defendem o uso da PCR para além da histologia para monitorizar a doença durante e após o tratamento ou para decidir a suspensão do mesmo<sup>2,22,79</sup>. Uma PCR negativa exclui a recidiva da doença, (valor preditivo negativo de 100%) sendo útil no caso de permanecerem alterações histológicas após o tratamento<sup>18</sup>, bem como para análise de todos os tecidos afetados<sup>62</sup>. Para além disso, se se fizer monitorização apenas histológica podem não ser detetadas recidivas, dado que as alterações histológicas nem sempre refletem as alterações químicas e laboratoriais<sup>2</sup>.

A microscopia eletrónica permite visualizar bacilos intactos e confirmar doença ativa e consequentemente tratamento inadequado<sup>18</sup>.

Nos casos de manifestações neurológicas só se deve suspender a antibioterapia quando a PCR do LCR e das amostras duodenais forem negativas, apesar da PCR poder positivar devido a remanescentes do DNA bacteriano ou por colonização luminal<sup>23,28</sup>. Alguns autores sugerem análise do LCR de 6 em 6 meses até o material bacteriano ser indetetável<sup>14</sup>. Outros recomendam que após o LCR negativar, deve ser repetida a PCR 6 meses e 36 meses depois<sup>22</sup>.

# Capítulo 4. Discussão

A DW surge como uma doença difícil de diagnosticar, devido à associação de diversos fatores que contribuem para que não seja considerada como diagnóstico provável, tais como:

- A sua raridade de ocorrência<sup>13-15</sup>.
- O facto de ter características clínicas inespecíficas e afetação de um leque de locais-alvo bastante vasto, pode ser confundida com um grande número de patologias<sup>15,61,63</sup>. Como tal, pode levar a que não sejam postos em prática exames auxiliares de diagnóstico dirigidos a esta patologia.
- O envolvimento cardíaco e do SNC é muitas vezes subclínico e pode ocorrer sem evidência clínica ou histológica de doença gastrointestinal<sup>15,61</sup>.
- Os métodos de diagnóstico mais usados nem sempre são fidedignos. Ou seja, tanto a coloração de PAS como a PCR podem negatizar mesmo com a presença de doença<sup>2,22,72</sup>. Tal facto pode levar a erros de diagnóstico se não forem feitos mais esforços para a repetição dos exames, ou se não forem usados outros meios para confirmar a suspeita, como a microscopia eletrónica, imunohistoquímica ou a técnica FISH.
- O *T. whipplei* não é facilmente cultivável, dado que este resiste à cultura por métodos microbiológicos standard e pode levar meses até à cultura ser obtida<sup>6,7,22,23,42,43</sup>, ao contrário do que acontece com a maioria das outras bactérias. Para além disso, trata-se de uma técnica limitada a laboratórios especializados. Assim, um método de diagnóstico que à partida seria tão fácil de ser realizado e que é uma ferramenta diagnóstica rotineira na prática clínica, não é útil para esta patologia.

A verdade é que se esta patologia não for ponderada como possível diagnóstico, pode acarretar consequências graves para os pacientes, inclusivamente a sua morte, tal como descrito por Muller *et al*<sup>88</sup>.

Aliado a estes fatores também está o facto do conhecimento acerca desta doença ainda não estar muito alargado a nível epidemiológico, etiológico e patogénico, o que torna difícil identificar a população em risco de desenvolver esta patologia.

Desde a descoberta da DW, foram vários os avanços alcançados com vista a compreender e caracterizar melhor esta doença que até então era considerada fatal e inexplicável. De facto, desenrolou-se cerca de um século de investigações para elucidar as complexidades desta doença, embora permanecendo ainda muitas questões por responder.

O genoma do *T.whipplei*, que apenas foi completamente sequenciado há 10 anos, revela características bastante específicas que torna difícil a sua classificação, e consequentemente a caracterização desta bactéria<sup>10</sup>.

Epidemiologicamente, os dados que existem são bastante escassos para poder determinar uma verdadeira incidência, muito provavelmente pela raridade de ocorrência da doença e talvez por poder estar subdiagnosticada. Quanto ao *habitat* da bactéria, tudo indica que o *T.whipplei* esteja integrado nas comunidades de microorganismos que habitam o solo e a água<sup>13,14</sup>. No entanto, a heterogeneidade de portadores assintomáticos que foram encontrados<sup>24,25,29,30</sup>, torna difícil inferir se a exposição ambiental é determinante para o aparecimento da bactéria no organismo ou se o *T.whipplei* é uma bactéria comensal humana. A verdade é que são ainda muitas as sugestões acerca do seu reservatório, fatores de risco e vias de infeção e transmissão, sem existir ainda um consenso a nível da comunidade científica.

Apesar da presumível presença ubiqüitária da bactéria no ambiente, o *T.whipplei* raramente causa doença, sugerindo uma predisposição genética do hospedeiro para o desenvolvimento da mesma. No entanto, os genes causadores ou os fatores imunes predisponentes ainda estão por identificar<sup>61</sup>, à exceção dos genes HLA DRB1\*13 and DQB1\*06 que foram implicados como fatores de risco do hospedeiro para a DW<sup>32</sup>. Estes genes foram encontrados numa população europeia, população esta uma das mais afetadas pela DW a nível mundial. Assim, sabendo que os alelos HLA variam de acordo com a raça e área geográfica, trata-se de um achado que apoia a predisposição genética associada à ocorrência desta doença.

Para além disso, as pistas encontradas indicam que já haja um defeito imunológico predisponente do hospedeiro que permite que o *T.whipplei* provoque doença. A apoiar este facto, Fenollar *et al*<sup>41</sup> demonstraram que apesar da diversidade genética das estirpes de *T.whipplei* encontradas, esta não influencia a patogenicidade da mesma, logo aponta para as características do hospedeiro como fator determinante na produção da doença. No entanto, não se consegue bem explicar se a bactéria também pode induzir esse defeito e em que consiste realmente, dado que muitos dos achados ainda são hipóteses prováveis. Contudo, é de salientar que já se avançou muito na compreensão desta patologia.

Como as manifestações clínicas são muito inespecíficas, deve-se ter em conta a evolução sintomática clássica e estar sempre atento às formas em que a doença pode ocorrer de forma

atípica, nomeadamente quando há envolvimento neurológico isolado. Aqui entra a importância da história clínica e da revisão da mesma, de forma a evitar erros de fixação e diagnósticos pré-definidos. Assim, torna-se importante avaliar todos os antecedentes pessoais para se poder abranger um maior leque de diagnósticos diferenciais. Por exemplo, num caso de um doente que apareça apenas com queixas de diarreia e perda ponderal, se não avaliarmos cuidadosamente os sintomas prévios como artralguas intermitentes há 2 anos, o diagnóstico provável de DW poderá não ser considerado. Desta forma, podemos alterar completamente o rumo terapêutico e melhorar a saúde dos pacientes, impedindo evoluções irreversíveis.

A possibilidade da DW se manifestar como uma doença aguda suscitou algum interesse e levanta questões. Raoult *et al*<sup>36</sup> associaram o *T.whipplei* a gastroenterite aguda em crianças, contudo a pergunta que se faz é: Este organismo causa gastroenterite ou a presença desta patologia permite o acesso da bactéria ao hospedeiro? Al Moussawi *et al*<sup>61</sup>, através de um modelo animal, aumentaram a credibilidade de que o *T.whipplei* pode invadir tecidos danificados de forma assintomática atuando com um agente oportunista. No entanto, a extensão em que ocorre em humanos e através de que mecanismos ainda permanece incerta. Também Bousbia *et al*<sup>70</sup> sugeriram o *T.whipplei* como potencial agente etiológico de pneumonia, carecendo contudo de evidências suficientes para confirmação dessa hipótese.

O método mais aceite atualmente como abordagem diagnóstica consiste na realização de biópsias intestinais e análise histológica com coloração PAS, seguidas de confirmação por PCR ou imunohistoquímica e avaliação de outros tecidos afetados<sup>23</sup>. No entanto, recentemente foi proposta outra abordagem que se inicia por um rastreio menos invasivo por PCR da saliva e fezes quando há suspeita de DW<sup>75</sup>. Na minha opinião, este método torna-se vantajoso na medida em que permite despistar rapidamente a presença da bactéria sem recorrer a um método invasivo. Desta forma, pode tornar-se um incentivo para que esta doença seja devidamente diagnosticada. Outro argumento a favor é o facto da coloração PAS não ser específica para esta bactéria podendo positivar na presença de outras<sup>61</sup>. Ainda assim, não podemos esquecer as limitações da PCR, nomeadamente na ocorrência de falsos positivos, daí a necessidade de consideração de outros métodos de diagnóstico.

A antibioterapia assume um papel crucial no tratamento da DW. No entanto, ainda há muitas divergências entre investigadores quanto ao melhor esquema terapêutico, em nada consensual. A verdade é que recidivas continuam a ocorrer, sendo estas muitas vezes irreversíveis.

Quanto ao seguimento dos doentes, há bastante controvérsia na literatura quanto à duração do seguimento dos doentes após o tratamento aparentemente bem sucedido e quanto aos métodos usados para esse propósito. No entanto, concluo que dada a franca possibilidade de

ocorrer recidivas, o seguimento destes doentes deve ser feito para toda a vida. Para além disso, a completa erradicação da bactéria destes indivíduos revela ser necessária. Ou seja, uma análise histológica com coloração PAS e/ou uma PCR persistentemente positiva apesar de ter sido feito tratamento eficaz com remissão clínica, não deve ser desvalorizado. Apesar destes exames poderem postivar devido apenas a remanescentes da bactéria biologicamente inativos ou devido a colonização intestinal<sup>18,23,76</sup>, não se sabe até que ponto é que os pacientes estejam totalmente curados. A verdade é que se pensa que os indivíduos que têm doença de Whipple têm predisposição genética e imunológica para desenvolver a mesma e, por isso, mesmo uma possível colonização poderia desencadear doença. Assim, é vital que essa erradicação seja confirmada, nomeadamente a nível cerebral através da obtenção de uma PCR do LCR negativa, porque a doença recidivante neurológica é um sinal ameaçador.

## Secção 4.1. Perspetivas futuras

Apesar dos avanços na investigação terem ajudado à compreensão, diagnóstico e tratamento da DW, ainda há aspetos que devem ser elucidados e procedimentos nos quais devem ser investidos, os quais passo a citar:

- O reservatório do *T.whipplei* deve ser identificado e esclarecida a hipótese da bactéria ser comensal humana.
- A identificação dos fatores de risco da doença e fatores predisponentes do hospedeiro podem ajudar na prevenção.
- Talvez a verdadeira incidência da infeção por *T.whipplei* possa diferir da que corresponde à DW reconhecida. Manifestações atípicas sem macrófagos PAS positivos podem existir e o espectro clínico completo pode diferir daquele que é conhecido.
- A possível caracterização do *T.whipplei* como um agente etiológico de doenças agudas como gastroenterite e pneumonia, deve ser clarificada.
- O genoma já foi completamente sequenciado, mas estudos posteriores devem ser feitos para providenciar mais informação acerca da fisiologia da bactéria e de mais sequências de DNA que possam ser usadas para propósitos diagnósticos, com vista à caracterização de genes possivelmente envolvidos no processo de doença infecciosa.
- Testes moleculares que não requerem procedimentos invasivos (ex: PCR de amostras de fezes em vez de amostras de biópsias duodenais) devem ser bem-vindos, tal como proposto por Fenollar et al<sup>75</sup>.

- Outros métodos diagnósticos, como a serologia e cultura, podem ser aprimorados. Atualmente, a identificação de agentes que causam infecções bacterianas é ainda baseada em métodos culturais e serologia. No entanto, a cultura do *T.whipplei* ainda é muito limitada e a serologia apresenta baixa sensibilidade e especificidade<sup>6,7,22,23</sup>.
- No futuro, o diagnóstico da DW é igualmente suscetível de ser auxiliado por meio da generalização da detecção de estruturas antigénicas detetadas por imunohistoquímica. O objetivo é permitir o diagnóstico mais precoce para reduzir a morbidade e talvez mortalidade desta doença curável<sup>77</sup>. Apesar da técnica FISH detetar e identificar diretamente a bactéria e ser por isso de uma utilidade indubitável<sup>76</sup>, a sua reduzida disponibilidade nos laboratórios comuns, limita o seu uso e daí que deverá ser estimulado o uso de técnicas mais acessíveis e de boa sensibilidade como a imunohistoquímica.
- Vários esquemas terapêuticos foram propostos de acordo com resultados diferentes obtidos em estudos e ,como tal, acho que se devia apostar em mais estudos prospetivos. Para além disso, devem ser feitos mais testes de suscetibilidade antibiótica, através da otimização dos métodos culturais, de forma a encontrar o esquema que seja mais eficaz, mais consensual e que resulte em menos complicações. A demonstração de que a doxiciclina juntamente com a hidroxicloroquina constituem o regime com maior efeito bactericida, deve impulsionar a realização de mais investigação de forma a comprovar a sua eficácia clínica, regime este já defendido por alguns autores como terapia promissora<sup>3,15,22,79,85</sup>. Também a terapia imunológica mostrou apresentar potencial terapêutico que deve ser alvo de investigação para avaliação da sua utilidade<sup>55</sup>.
- Estudos prospetivos devem ser realizados para avaliação do melhor tratamento para as complicações da DW, nomeadamente da SIRI, uma vez que apesar de já ter sido verificada uma resposta favorável aos corticosteróides, ainda não há evidências quanto à sua eficácia<sup>86,87</sup>.
- A deteção de IL-16 circulante e de marcadores de apoptose poderão ser usados como ferramentas de prognóstico, tal como proposto por Benoit *et al*<sup>59</sup>.
- Determinar como o *T.whipplei* desregula ou suprime a resposta do hospedeiro requer mais exploração dos mecanismos moleculares específicos ou processos envolvidos. Estudos futuros acerca da sua patogenia podem aumentar o nosso conhecimento e assim providenciar novas perceções para o diagnóstico e tratamento da DW.

Também no nosso país se deve investir nesta doença. Uma vez que Portugal é um país da Europa, que é uma das principais áreas geográficas de maior incidência da DW, deve-se incentivar à aquisição de mais conhecimentos acerca desta patologia por parte dos profissionais de saúde portugueses. Desta forma, a DW pode ser alvo de suspeita clínica e consequente abordagem diagnóstica dirigida, evitando-se assim que esta se agrave ou se torne fatal. Para além disso, futuras investigações podem ser realizadas, nomeadamente com vista à elaboração de uma base de dados dos doentes diagnosticados com DW em Portugal. Assim, poderemos avaliar a verdadeira incidência desta doença no nosso país e quais as regiões mais afetadas.

# Bibliografia

1. Pyrgioti M, Kyriakidis A. Whipple's disease: a review. *Ann Gastroenterol.* 2004;17(1):43-50.
2. Oliveira L, Gorjão R, Ramos de Deus J. Doença de Whipple. *J Port Gastreterol.* 2010;17:69-77.
3. Afshar P, Redfield DC, Higginbottom PA. Whipple's disease: A rare disease revisited. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12:263-9.
4. Bolt R, Pollard M, Standaert L. Transoral small-bowel biopsy as an aid in the diagnosis of malabsorption rates. *N Engl J Med.* 1958;259(5):32-4.
5. Relman D., Schmidt T, Mac-Dermott R F. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med.* 1992;327(5):283-301.
6. Schoedon G, Goldenberger D, Forrer R, Gunz A, Dutly F, Höchli M, et al. Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of *Tropheryma whippelii*. *J Infect Dis.* 1997 Sep;176:672-7.
7. Raoult D, Birg ML, La Scola B, Fournier P, Enea M. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med.* 2000;342(9):620-5.
8. Raoult D, La Scola B, Lecocq P, Lepidi H, Fournier PE. Culture and immunological detection of *Tropheryma whippelii* from the duodenum of a patient with Whipple disease. *JAMA.* 2001 Feb 28;285(8):1039-43.
9. Scola B La, Fenollar F, Fournier P, Altwegg M. Description of *Tropheryma whipplei* gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1471-9.
10. Bentley SD, Maiwald M, Murphy LD, Pallen MJ, Yeats CA, Dover LG, et al. Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whippelii*. *The Lancet.* 2003;361:637-44.
11. Raoult D, Ogata H, Audic S, Robert C, Suhre K, Drancourt M, et al. *Tropheryma whippelii* Twist: a human pathogenic Actinobacteria with a reduced genome. *Genome Res.* 2003 Aug;13:1800-9.
12. Renesto P, Crapoulet N, Ogata H, La Scola B, Vestris G, Claverie J-M, et al. Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whippelii*. *The Lancet.* 2003 Aug 9;362:447-9.
13. Maiwald M, Schuhmacher F, Ditton H-J, Von Herbay A. Environmental occurrence of the Whipple's disease bacterium (*Tropheryma whippelii*). *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(2):760-2.
14. Marth T, Raoult D. Whipple's disease. *The Lancet.* 2003;361:239-46.
15. Fenollar F, Puéchal X, Raoult D. Whipple's disease. *N Engl J Med.* 2007 May;356(1):55-66.

16. Abreu P, Azevedo E, Lobo L, Moura CS, Pontes C. Doença de Whipple e Sistema Nervoso Central. *Acta Med Port.* 2005;18:199-208.
17. Maiwald M. Update on Whipple's disease and *Tropheryma whippelii*. *Clin Microbiol Newsletter.* 2006;28(23):177-84.
18. Carneiro A, Lima P, Barbosa IP, Chaves FC. Doença de Whipple Um Desafio Diagnóstico. *Acta Med Port.* 2004;17:481-6.
19. Silva M, Bragança I, Parreira M, Pedroso E, Miranda C. Doença de Whipple - um caso. *Medicina Interna.* 2002;9(2):87-91.
20. Oliveira J, Araújo E, Crespo J, Almiro E. Poliartrite arrastada e doença de Whipple - a propósito de um caso clínico. *Medicina.* 2004;11(2):82-6.
21. Ojeda E, Cosme A, Lapaza J, Torrado J. Whipple's disease in Spain : a clinical review of 91 patients diagnosed between 1947 and 2001. *Rev Esp Enferm Dig.* 2010;102(2):108-23.
22. Schneider T, Moos V, Loddenkemper C, Marth T, Fenollar F, Raoult D. Whipple's disease : new aspects of pathogenesis and treatment. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:179-90.
23. Moos V, Schneider T. Changing paradigms in Whipple's disease and infection with *Tropheryma whippelii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Oct;30:1151-8.
24. Schöniger-Hekele M, Petermann D, Weber B, Müller C. *Tropheryma whippelii* in the environment: survey of sewage plant influxes and sewage plant workers. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Mar;73(6):2033-5.
25. Fenollar F, Trani M, Davoust B, Salle B, Birg M-L, Rolain J-M, et al. Prevalence of asymptomatic *Tropheryma whippelii* carriage among humans and nonhuman primates. *J Infect Dis.* 2008 Mar 15;197:880-7.
26. Feurle GE, Junga NS, Marth T. Efficacy of Ceftriaxone or Meropenem as initial therapies in Whipple's disease. *Gastroenterology.* Elsevier Inc.; 2010;138(2):478-86.
27. Fenollar F, Lepidi H, Drancourt M, Raoult D. Whipple Disease associated with Giardiasis. *J Infect Dis.* 2003;188:828-34.
28. Flemmer MC, Flenner RW. Toward a new understanding of Whipple's disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2000 Jul;2:299-304.
29. Ehrbar HU, Bauerfeind P, Dutly F, Koelz HR, Altwegg M. PCR-positive tests for *Tropheryma whippelii* in patients without Whipple's disease. *The Lancet.* 1999 Jun 26;353:2214.
30. Street S, Donoghue H, Neild G. *Tropheryma whippelii* DNA in saliva of healthy people. *The Lancet.* 1999;354:1178-9.
31. Feurle G, Dorken B, Schopf E, Lenhard V. HLA B27 and defects in the T-cell system in Whipple's disease. *Eur J Clin Invest.* 1979;9:385-9.
32. Martinetti M, Biagi F, Badulli C, Feurle GE, Müller C, Moos V, et al. The HLA alleles DRB1\*13 and DQB1\*06 are associated to Whipple's disease. *Gastroenterology.* AGA Institute American Gastroenterological Association; 2009 Jun;136(7):2289-94.

33. Leon MP, Borghi A, Ferrara F, Contri M, Roncucci L. Whipple's disease in a father-son pair. *Intern Emerg Med*. 2006 Sep;1(3):254-6.
34. Dykman DD, Cuccherini B, Fuss IJ, Blum L, Woodward J, Strober W. Whipple's disease in a father-daughter pair. *Digest Dis Sci*. 1999;44(12):2542-4.
35. Fenollar F, Keita AK, Buffet S, Raoult D. Intrafamilial circulation of *Tropheryma whippelii*, France. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(6):949-55.
36. Raoult D, Fenollar F, Rolain JM, Minodier P, Bosdure E, Li W, et al. *Tropheryma whippelii* in children with gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2010 May;16(5):776-82.
37. Fenollar F, Trape J-F, Bassene H, Sokhna C, Raoult D. *Tropheryma whippelii* in fecal samples from children, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2009 Mar 15;15(6):922-4.
38. Maiwald M, Ditton H, Herbay AVON, Rainey FA, Stackebrandt E. Reassessment of the phylogenetic position of the bacterium associated with Whipple's disease and determination of the 16s-23s ribosomal intergenic spacer sequence. *Int J Sys Bacteriol*. 1996;46(4):1078-82.
39. Hinrikson HP, Dutly F, Nair S, Altwegg M. Detection of three different types of "*Tropheryma whippelii*" directly from clinical specimens by sequencing, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and type-specific PCR of their 16S-23S ribosomal intergenic spacer region. *Int J Sys Bacteriol*. 1999 Oct;49:1701-6.
40. Maiwald M, Von Herbay A, Lepp PW, Relman D a. Organization, structure, and variability of the rRNA operon of the Whipple's disease bacterium (*Tropheryma whippelii*). *J Bacteriol*. 2000 Jun 1;182(11):3292-7.
41. Li W, Fenollar F, Rolain J, Fournier P, Feurle GE, Mu C, et al. Genotyping reveals a wide heterogeneity of *Tropheryma whippelii*. *Microbiology*. 2008;154:521-7.
42. Maiwald M, Von Herbay A, Fredricks DN, Ouverney CC, Kosek JC, Relman D a. Cultivation of *Tropheryma whippelii* from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis*. 2003 Sep 15;188:801-8.
43. Masselot F, Boulos A, Maurin M, Rolain JM, Raoult D. Molecular evaluation of antibiotic susceptibility: *Tropheryma whippelii* paradigm. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2003;47(5):1658-64.
44. Crapoulet N, Barbry P, Raoult D, Renesto P. Global transcriptome analysis of *Tropheryma whippelii* in response to temperature stresses. *J Bacteriol*. 2006 Jul;188(14):5228-39.
45. Fredricks DN, Relman DA. Localization of *Tropheryma whippelii* rRNA in tissues from patients with Whipple's disease. *J Infect Dis*. 2001;183:1229-37.
46. Dobbins III W, Ruffin J. A light and electron microscopic study of bacterial invasion in Whipple's disease. *Am J Clin Pathol*. 1967;51(2):225-42.
47. Moos V, Schneider T. The role of T cells in the pathogenesis of classical Whipple's disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Mar;10(3):253-5.
48. Arosa F, Cardoso E, Pacheco F, Cardoso Â, Melo J, Coito A, et al. Capítulo 8: Linfócitos T. In: LIDEL, editor. *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa; 2007. p. 137-45.

49. Marth T, Kleen N, Stallmach A, Ring S, Aziz S, Schmidt C, et al. Dysregulated peripheral and mucosal Th1/Th2 response in Whipple's disease. *Gastroenterology*. 2002 Nov;123(5):1468-77.
50. Moos V, Kunkel D, Marth T, Gerhard E, Lascola B, Ignatius R, et al. Reduced peripheral and mucosal *Tropheryma whipplei*-specific Th1 response in patients with Whipple's disease. *J Immunol*. 2006;177:2015-22.
51. Schinnerling K, Moos V, Geelhaar A, Allers K, Loddenkemper C, Friebel J, et al. Regulatory T cells in patients with Whipple's disease. *J Immunol*. 2011 Oct 15;187:4061-7.
52. Moos V, Schmidt C, Geelhaar A, Kunkel D, Allers K, Schinnerling K, et al. Impaired immune functions of monocytes and macrophages in Whipple's disease. *Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2010 Jan;138(1):210-20.
53. Desnues B, Ihrig M, Raoult D, Mege J. Whipple's disease: a macrophage disease. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(2):170-8.
54. Marth T, Neurath M, Cuccherini B, Strober W. Defects of monocyte interleukin 12 production and humoral immunity in Whipple's disease. *Gastroenterology*. 1997 Aug;113(2):442-8.
55. Schneider T, Stallmach A, Von Herbay A, Marth T, Zeitz M. Treatment of refractory Whipple disease with Interferon  $\gamma$ . *Ann Intern Med*. 1998;129(11):875-7.
56. Al Moussawi K, Ghigo E, Kalinke U, Alexopoulou L, Mege J-L, Desnues B. Type I interferon induction is detrimental during infection with the Whipple's disease bacterium, *Tropheryma whipplei*. *PLoS pathog*. 2010 Jan;6(1):1-13.
57. Raoult D, Mege J, Alerts E. IL-16 is critical for *Tropheryma whipplei* replication in Whipple's disease. *J Immunol*. 2005;175:4575-82.
58. Zhang Y, Center DM, Wu DM, Cruikshank WW, Yuan J, Andrews DW, et al. Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J Biol Chem*. 1998 Jan 9;273(2):1144-9.
59. Benoit M, Fenollar F, Raoult D, Mege J-L. Increased levels of circulating IL-16 and apoptosis markers are related to the activity of Whipple's disease. *PloS one*. 2007 Jan;2(6):1-6.
60. Gorvel L, Al Moussawi K, Ghigo E, Capo C, Mege J-L, Desnues B. *Tropheryma whipplei*, the Whipple's disease bacillus, induces macrophage apoptosis through the extrinsic pathway. *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group; 2010 Jan;1(34):1-8.
61. Desnues B, Moussawi K Al, Fenollar F. New insights into Whipple's disease and *Tropheryma whipplei* infections. *Microbes Infect*. Elsevier Masson SAS; 2010;12(14-15):1102-10.
62. Biagi F, Trotta L, Corazza GR. Whipple's disease. *Intern Emerg Med*. 2012;7(3):209-13.
63. Dutly F, Altwegg M. Whipple's disease and "*Tropheryma whippelii*". *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3):561-83.
64. Puéchal X, Fenollar F, Raoult D. Cultivation of *Tropheryma whipplei* from the synovial fluid in Whipple's arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 May;56(5):1713-8.

65. Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Whipple's endocarditis: review of the literature and comparisons with Q Fever , Bartonella infection , and blood culture-positive endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1309-16.
66. Rickman L, Freeman W, Green W, Feldman S. Brief report: uveitis caused by *Tropheryma whippelii* (Whipple's bacillus). *N Engl J Med*. 1995;332(6):363-6.
67. Anderson M. Neurology of Whipple's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000 Jan 1;68(1):2-5.
68. Geissdörfer W, Moos V, Moter A, Loddenkemper C, Jansen A, Tandler R, et al. High frequency of *Tropheryma whippelii* in culture-negative endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2012 Feb;50(2):216-22.
69. Panegyres PK, Edis R, Beaman M, Fallon M. Primary Whipple's disease of the brain: characterization of the clinical syndrome and molecular diagnosis. *Q J Med*. 2006 Sep;99:609-23.
70. Bousbia S, Papazian L, Auffray J, Fenollar F, Martin C, Li W, et al. *Tropheryma whippelii* in patients with pneumonia. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(2):258-63.
71. Herbay A Von, Maiwald M, Ditton H-J, Otto H. Histology of intestinal Whipple ' s disease revisited. *Virchows Arch*. 1996;429:335-43.
72. Fenollar F, Laouira S, Lepidi H, Rolain J-M, Raoult D. Value of *Tropheryma whippelii* quantitative polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Whipple disease: usefulness of saliva and stool specimens for first-line screening. *Clin Infect Dis*. 2008 Sep 1;47:659-67.
73. Fenollar F, Fournier P, Raoult D, Gérolami R. Quantitative detection of *Tropheryma whippelii* DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1119-20.
74. Yajima N, Wada R, Kimura S, Matsuzaki Y, Chiba D. Whipple Disease diagnosed with PCR using formalin-fixed paraffin-embedded specimens of the intestinal mucosa. *Intern Med*. 2013;52:219-22.
75. Edouard S, Fenollar F, Raoult D. The rise of *Tropheryma whippelii*: a 12-year retrospective study of PCR diagnoses in our reference center. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):3917-20.
76. Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D, Petrich A, Gescher DM, Halle E, et al. Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jun;16(6):767-73.
77. Baisden BL, Lepidi H, Raoult D, Argani P, Yardley JH, Dumler JS. Diagnosis of Whipple disease by Immunohistochemical analysis. A sensitive and specific method for the detection of *Tropheryma whippelii* ( the Whipple bacillus) in paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:742-8.
78. Maiwald M, Relman DA. Whipple's Disease and *Tropheryma whippelii*: secrets slowly revealed. *Clin Infect Dis*. 2001;32:457-63.
79. Lagier J, Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Failure and relapse after treatment with trimethoprim/sulfamethoxazole in classic Whipple's disease. *J Antimicrob Chemoter*. 2010;65:2005-12.

80. Feurle GE, Marth T. An evaluation of antimicrobial treatment for Whipple's disease Tetracycline versus Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Digest Dis Sci.* 1994;39(8):1642-8.
81. Boulos A, Rolain J, Raoult D. Antibiotic susceptibility of *Tropheryma whipplei* in MRC5 cells. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2004;48(3):747-52.
82. Boulos a, Rolain JM, Mallet MN, Raoult D. Molecular evaluation of antibiotic susceptibility of *Tropheryma whipplei* in axenic medium. *J Antimicrob Chemoter.* 2005 Feb;55(2):178-81.
83. Fenollar F, Rolain J-M, Alric L, Papo T, Chauveheid M-P, Van de Beek D, et al. Resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole and *Tropheryma whipplei*. *Int J Antimicrob Ag.* 2009 Sep;34(3):255-9.
84. Ghigo E, Capo C, Aurouze M, Tung C, Gorvel J, Raoult D, et al. Survival of *Tropheryma whipplei* , the agent of Whipple's disease, requires phagosome acidification. *Infect Immun.* 2002;70(3):1501-6.
85. Lagier J-C, Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Evidence of lifetime susceptibility to *Tropheryma whipplei* in patients with Whipple's disease. *J Antimicrob Chemoter.* 2011 May;1188-9.
86. Feurle G, Moos V, Schinnerling K, Geelhar A. The Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Whipple disease- A cohort study. *Ann Intern Med.* 2010;153:710-7.
87. Biagi F, Trotta L, Stefano M, Balduzzi D, Marchese A, Vattiato C, et al. Previous immunosuppressive therapy is a risk factor for immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease. *Digest Liver Dis.* 2012;44:880-2.
88. Müller S a, Vogt P, Altwegg M, Seebach JD. Deadly carousel or difficult interpretation of new diagnostic tools for Whipple's disease: case report and review of the literature. *Infection.* 2005 Feb;33(1):39-42.