



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



KELLY CRISTINE MOURA COSTA PEDROZA

**DETECÇÃO DO ANTÍGENO GALACTOMANANA
PARA DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSE INVASIVA
EM PACIENTES NEUTROPÊNICOS**

Salvador - Bahia

2013

KELLY CRISTINE MOURA COSTA PEDROZA

**DETECÇÃO DO ANTÍGENO GALACTOMANANA
PARA DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSE INVASIVA
EM PACIENTES NEUTROPÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima.

Salvador - Bahia

2013

P372 Pedroza, Kelly Cristine Moura Costa
Detecção do antígeno galactomanana para diagnóstico de aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos / Kelly Cristine Moura Costa Pedroza. – Salvador, 2013.
78 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.
Co-Orientadora: Profa.Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1.Galactomanana. 2. ELISA-GM. 3. Aspergilose invasiva. 4. Neutropenia. I.Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. II.Nascimento, Roberto José Meyer. III.Lima, Fernanda Washington de Mendonça. IV. Título.

CDU 577.27:616-097



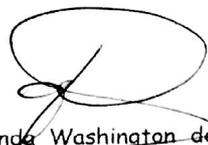
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA KELLY CRISTINE MOURA COSTA PEDROZA

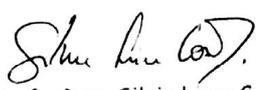
Aos onze dias do mês de abril do ano de dois mil e treze às quatorze horas no Auditório Ophélia Gaudenzi no 3º andar no Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Roberto José Meyer Nascimento, Orientador, Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima, Co-Orientadora, Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araujo, e Dra. Tânia Fraga Barros se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "DETECÇÃO DO ANTÍGENO GALACTOMANANA PARA DIAGNÓSTICO DA ASPERGILOSE INVASIVA EM PACIENTES NEUTROPÊNICOS" da Mestranda Kelly Cristine Moura Costa Pedroza. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Dissertação aprovada, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora, pelo Mestrando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Salvador, 11 de abril de 2013.

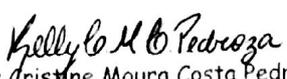

Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Orientador


Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima
Co-Orientadora


Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araujo
Banca Examinadora


Dra. Tânia Fraga Barros
Banca Examinadora


Profa. Dra. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS-UFBA


Kelly Cristine Moura Costa Pedroza
Mestranda

Aos pacientes oncológicos atendidos no serviço de hematologia do Hospital Universitário
Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio em diversos momentos. Em especial ao meu pai, meu melhor amigo e maior exemplo de perseverança; minha mãe, por me ensinar os valores mais importantes que carrego; ao meu irmão, Júnior, pelo amor e companheirismo de sempre; a minha irmã, Laís, pela graça e doçura que traz aos nossos dias; e aos primos Cecília e Filipe, verdadeiros irmãos que estiveram sempre presentes durante minha jornada.

Aos meus amigos, desde aqueles de sempre aos que conquistei durante o curso de mestrado no PPGIm.

A toda equipe do SIDI, que fazem do laboratório mais do que ambiente de trabalho, um lar.

Ao Msc. Sócrates, que além de amigo tem sido grande parceiro em ideias, estudos, projetos. Sua contribuição para este trabalho foi de suma importância desde o início.

Ao pessoal do serviço de hematologia do HUPES, em especial ao Dr. Marco Aurélio e a Dra. Mônica Botura, sempre muito solícitos e comprometidos com a execução deste projeto.

Ao meu orientador, professor Dr. Roberto Meyer, pela oportunidade crescimento científico que me proporcionou.

Aos mestres que contribuíram para minha formação de uma maneira geral e principalmente a professora Dra. Fernanda Lima, que desde épocas de iniciação científica sempre apontou e confiou em meu potencial. Muito obrigada!

A Deus, sempre iluminando meus caminhos...

RESUMO

Aspergilose invasiva (AI) é uma importante causa de morbidade e mortalidade entre pacientes neutropênicos com câncer hematológico. O diagnóstico desta doença fúngica invasiva (DFI) permanece um desafio, especialmente devido a seus sintomas inespecíficos e falta de sensibilidade e especificidade de testes que utilizam metodologia não invasiva. A detecção de galactomanana (GM) em amostras de fluidos biológicos foi recentemente incluída como um critério micológico para AI “provável” em consenso para diagnóstico de DFI elaborado pela *European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infection Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group* (EORTC/MSG). A GM é um antígeno solúvel liberado durante o crescimento da hifa no tecido. O teste de detecção é um ELISA sanduíche (ELISA-GM) que tem um excelente valor preditivo negativo no diagnóstico da AI em pacientes de alto risco e pode apresentar índices positivos antes das manifestações clínicas da doença. O objetivo deste estudo foi investigar a incidência da AI em pacientes neutropênicos com doenças hematológicas malignas acompanhados pelo serviço de hematologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brasil. Foram feitos monitoramentos com testes seriados para detecção de GM em amostras de soro em episódios de neutropenia e os resultados foram associados com dados clínicos dos pacientes. Um total de 102 episódios foi incluído de maio de 2011 a julho de 2012, 48 dos quais com neutropenia prolongada (< 500 neutrófilos/mm³ por mais que 10 days). Um caso com critérios para AI “provável” e quatro com critérios para AI “possível” foram detectados. Um caso com índices positivos seriados em teste de GM sem critério radiológico foi observado; este episódio pode ter representado um estágio inicial da infecção. Os dados obtidos foram condizentes com as descrições sobre a utilidade do ELISA-GM como ferramenta para diagnóstico da AI; entretanto, a associação com outros testes não invasivos pode melhorar sua aplicação na prática clínica.

Palavras-chave: galactomanana; ELISA-GM; aspergilose invasiva; neutropenia.

ABSTRACT

Invasive aspergillosis (IA) is a major cause of morbidity and mortality among neutropenic patients with hematological cancer. The diagnosis of this invasive fungal disease (IFD) remains a challenge, especially due its unspecific symptoms and lack of sensitive and specific noninvasive diagnostic tests. The detection of galactomannan (GM) in biological fluids samples was recently included as a mycological criterion for “probable” IA in consensus for DFI diagnosis elaborated by European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infection Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG). The GM is a soluble antigen released during hyphal growth in tissues. The detection test is an ELISA sandwich (GM-ELISA) that has an excellent negative predictive value in the diagnosis of AI in high-risk patients and it can present positive indexes before clinical manifestations of the disease. The aim of this study was to investigate the incidence of AI in neutropenic patients with hematological malignances attended by the hematological service of University Hospital Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, Brazil. Serial screening for serum GM was made in neutropenia episodes and the results were associated with patients’ clinical data. A total of 102 episodes was included from May 2011 to July 2012, 48 of this were prolonged neutropenia (< 500 neutrophils/mm³ for > 10 days). A case with criteria for “probable” IA and four with criteria “possible” IA were detected. A case of serial positive serum indexes in GM test without radiologic criteria was observed; this episode may have represented an earlier stage of the infection. The data were consistent with the descriptions of usefulness of GM-ELISA as a tool for AI diagnosis; however, the association with other noninvasive test can improve its application in clinical practice.

Keywords: galactomannan; GM-ELISA; invasive aspergillosis; neutropenia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Espectro das doenças causadas por espécies de *Aspergillus* em função da resposta imune do hospedeiro. ABPA, aspergilose broncopulmonar alérgica. **Fonte:** PARK e MEHRAD. “Innate Immunity to *Aspergillus* species”. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009.....16
- Figura 2** Representação esquemática dos componentes da resposta imune do hospedeiro ao conídio de *Aspergillus* inalado. PMN, células polimorfonucleares; NK, células *Natural Killer*. **Fonte:** PARK e MEHRAD. “Innate Immunity to *Aspergillus* species”. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009.....18
- Figura 3** Reclassificação de casos de aspergilose invasiva a partir de critérios revisados pela EORTC/MSG. **Fonte:** TSITSIKAS e cols. “Impact of the revised (2008) EORTC/MSG definitions for invasive fungal disease on the rates of diagnosis of invasive aspergillosis”. *Medical Mycology*, 2011.....24
- Figura 4** Distribuição das condições primárias predisponentes para aspergilose invasiva em ensaio do voriconazol e em ensaio do Ambiload (total de pacientes = 478). **Fonte:** HERBRECHT e col. “Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients”. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2012.....29
- Figura 5** Fluxograma do procedimento de preparo da amostra de soro e técnica de ELISA utilizando o kit Platelia™ *Aspergillus*, BioRad, França.....36
- Figura 6** Frequência das principais doenças de base e distribuição das fases de quimioterapia.....42
- Figura 7** Frequência da utilização de antifúngicos entre os episódios de neutropenia monitorados.....43
- Figura 8** Estratificação dos episódios de neutropenia de acordo com apresentação de sinais característicos de doença fúngica invasiva em tomografia computadorizada (TC) de tórax e resultado positivo em imunensaio enzimático de detecção de galactomanana (GM) em amostras de soro.....45
- Figura 9** Índices de D.O. em ensaio de detecção de GM durante monitoramento do episódio referente ao grupo 1 (Neut.: contagem absoluta de neutrófilos em células / μ L).....46

- Figura 10** Índices de D.O. em ensaio de detecção de GM durante monitoramento do episódio pertencente ao grupo 3 onde foram vistos mais que dois índices positivos (Neut.: contagem absoluta de neutrófilos em células / μL).....50
- Figura 11** Representação gráfica da reprodutibilidade de resultados positivos do ensaio imunoenzimático de detecção de GM mostrando os índices de D.O. no primeiro (GM1) e segundo (GM2) teste.....54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características gerais dos episódios do grupo 2	47
Quadro 2	Características gerais dos episódios do grupo 3	49
Quadro 3	Características gerais dos episódios do grupo 4	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios para diagnóstico da doença fúngica invasiva (DFI) em pacientes com câncer e receptores de células tronco hematopoiéticas. Fonte: Adaptado de DE PAUW, 2008.....	23
Tabela 2	Fatores associados com resultados falsos negativos e falsos positivos em imunoenensaio enzimático de detecção de galactomanana (ELISA-GM) Fonte: Adaptado de AQUINO, 2007.....	27
Tabela 3	Características gerais dos episódios de neutropenia monitorados durante o estudo.....	40
Tabela 4	Características gerais dos pacientes participantes do estudo.....	41
Tabela 5	Uso de voriconazol <i>versus</i> resultados em ensaios de detecção de GM em total de episódios de neutropenia febril (n=63).....	43
Tabela 6	Uso de piperacilina-tazobactam <i>versus</i> resultados em ensaios de detecção de GM em total de episódios de neutropenia febril (n=63).....	44
Tabela 7	Uso de piperacilina-tazobactam <i>versus</i> resultados em ensaios de detecção de GM em total de episódios de neutropenia envolvidos no estudo (n=102).....	44
Tabela 8	Características gerais dos episódios de neutropenia prolongada (Neutrófilos < 500 células / μ L por mais que 10 dias).....	52
Tabela 9	Características das amostras retestadas.....	54

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AI	Aspergilose invasiva
BDG	B-D-glucana
D.O.	Densidade ótica
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin</i>
DFI	Doença fúngica invasiva
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EORTC/MSG	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infection Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group</i>
GM	Galactomanana
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLC	Leucemia linfóide crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MM	Mieloma múltiplo
PMAP	Padrão molecular associado a patógeno
RRP	Receptor de reconhecimento de padrão
TC	Tomografia computadorizada
TLR2	<i>Toll like receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TMO	Transplante de medula óssea

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Imunopatogênese da aspergilose invasiva.....	16
2.2 Diagnóstico da aspergilose invasiva e a detecção do antígeno galactomanana.....	21
2.3 Aspectos epidemiológicos da aspergilose invasiva.....	28
2.4 Estratégias antifúngicas para a aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos.....	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. METODOLOGIA.....	35
4.1 Desenho do estudo.....	35
4.2 Critérios de inclusão e de exclusão.....	37
4.3 Análises estatísticas.....	37
4.4 Considerações éticas.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Características gerais e clínicas dos episódios de neutropenia / pacientes participantes do estudo.....	39
5.2 Associação entre resultados de imunoensaio enzimático para detecção do antígeno GM e características clínicas dos episódios de neutropenia.....	44
5.3 Características clínicas do episódio com achado característico de DFI em TC de tórax associado a resultados positivos em imunoensaio de detecção de galactomanana (grupo 1).....	45
5.4 Características clínicas dos episódios com achados característicos de DFI em TC de tórax e sem resultados positivos em imunoensaios de detecção de galactomanana (grupo 2).....	46
5.5 Características clínicas dos episódios com resultados positivos em imunoensaios de detecção de galactomanana não associados a achados característicos de DFI em TC de tórax (grupo 3).....	48
5.6 Características clínicas dos episódios sem achados característicos de DFI em TC de tórax e sem resultados positivos em imunoensaios de detecção de galactomanana (grupo 4).....	50
5.7 Características gerais dos episódios de neutropenia prolongada.....	52
5.8 Reprodutibilidade dos resultados positivos em imunoensaio enzimático para a detecção de galactomanana em amostras de soro.....	53
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	63

Referências.....	65
APÊNDICE A - Ficha para solicitação da dosagem de galactomanana.....	69
APÊNDICE B - Formulário de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo do HUPES.....	70
APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	71
ANEXO A - Características gerais e clínicas dos episódios de neutropenia excluídos.....	72
ANEXO B - Produtos acadêmicos e científicos gerados.....	73

1. INTRODUÇÃO

A aspergilose invasiva (AI) é uma doença fúngica invasiva (DFI) causada por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos. Trata-se de uma importante causa de morbidade e mortalidade entre pacientes neutropênicos portadores de doenças hematológicas submetidos à quimioterapia ou transplante de medula óssea, especialmente do tipo alogênico (DAGENAIS, KELLER, 2009; KRADIN, MARK, 2008; PARK, MEHRAD, 2009).

O diagnóstico da AI representa um desafio e é dado em níveis de probabilidade definidos em consenso elaborado pela *European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infection Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group* (EORTC/MSG), ao menos para pesquisa clínica e epidemiológica. Os níveis de probabilidade são “possível”, “provável” e “provada”, sendo que para este último é necessária a comprovação da presença do agente infeccioso a partir de biópsia de sítio de infecção, que em geral acomete o pulmão. Para a classificação da DFI nos demais níveis de probabilidade deve ser feita a avaliação do conjunto: fatores do hospedeiro, úteis para o reconhecimento de indivíduos com predisposição ao desenvolvimento de DFI (neutropenia prolongada, por exemplo); critérios clínicos, que no caso da AI pulmonar são os sinais característicos em tomografia computadorizada de tórax; e o critério micológico, constituído por testes diretos de microscopia ou cultura, e os testes indiretos incluídos recentemente, que são a detecção do antígeno galactomanana (para AI) e da β -D-glucana (ASCIOGLU, 2002; DE PAUW, 2008).

Além da utilidade diagnóstica, o monitoramento de pacientes neutropênicos com a dosagem seriada do antígeno galactomana GM tem se mostrado útil para a instituição da terapia antifúngica preemptiva e para avaliação de tratamento e diagnóstico da AI (MAERTENS, 2005; MICELI, 2008; PARK, 2010; TAN, 2011).

Existem ainda poucos dados disponíveis sobre a epidemiologia da AI no Brasil e principalmente no Nordeste do país (OLIVEIRA, 2002; NUCCI, 2012). Ademais, são poucos os hospitais com serviço de hematologia / oncologia que dispõem do teste de detecção de GM para monitoramento dos pacientes em período de risco. Logo, faz-se importante o estudo e a produção de dados sobre a incidência da DFI entre pacientes com doenças hematológicas na Bahia, assim como sobre a aplicação do imunoenensaio enzimático de detecção de GM para diagnóstico da AI nesta população.

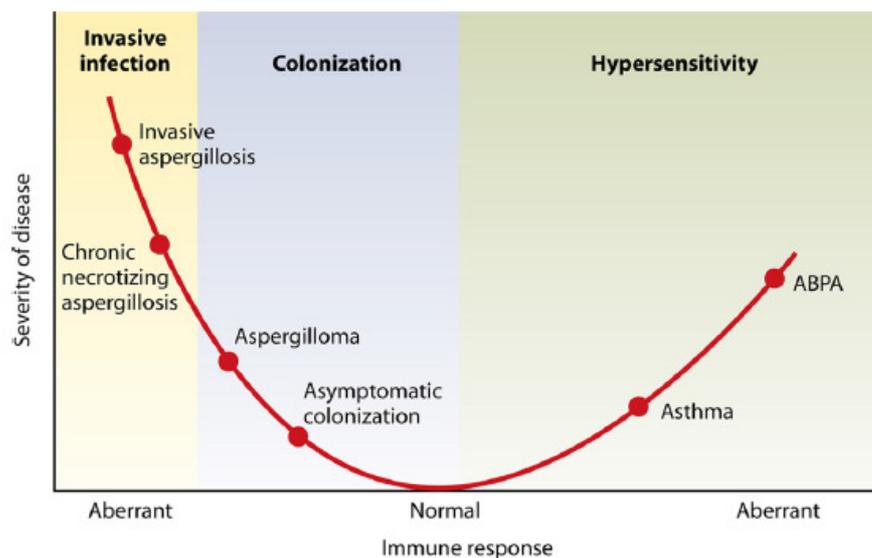
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Imunopatogênese da aspergilose invasiva

As espécies do gênero *Aspergillus* são caracterizadas como fungos filamentosos, hialinos, septados. São espécies predominantemente saprófitas, que crescem em matéria orgânica morta e em decomposição em diversos ambientes (DAGENAIS, KELLER, 2009). Reproduzem-se assexuadamente através da produção de conídios, estruturas esféricas de camada externa hidrofóbica e tamanho relativamente pequeno (2 a 5 μm de diâmetro) com característica facilidade de dispersão no ar (PARK, MEHRAD, 2009).

Estas estruturas são produzidas em grandes quantidades e os humanos podem inalar centenas destas diariamente. Em virtude disso a maioria das doenças causadas por *Aspergillus* se inicia no trato respiratório após inalação dos conídios (PARK, MEHRAD, 2009). Este agente pode causar uma variedade de doenças a depender do *status* de imunidade do hospedeiro, estas que são classificadas em três categorias: infecções invasivas, caracterizada pelo crescimento da hifa invadindo o tecido; colonização dos tecidos mucosos; doenças de hipersensibilidade (KRADIN, MARK, 2008; PARK, MEHRAD, 2009). Na Figura 1 pode ser vista a representação esquemática das doenças causadas por *Aspergillus* spp. e suas relações com *status* de imunidade do hospedeiro. Nota-se que a aspergilose invasiva manifesta-se no extremo de imunocromprometimento do hospedeiro e representa uma doença grave.

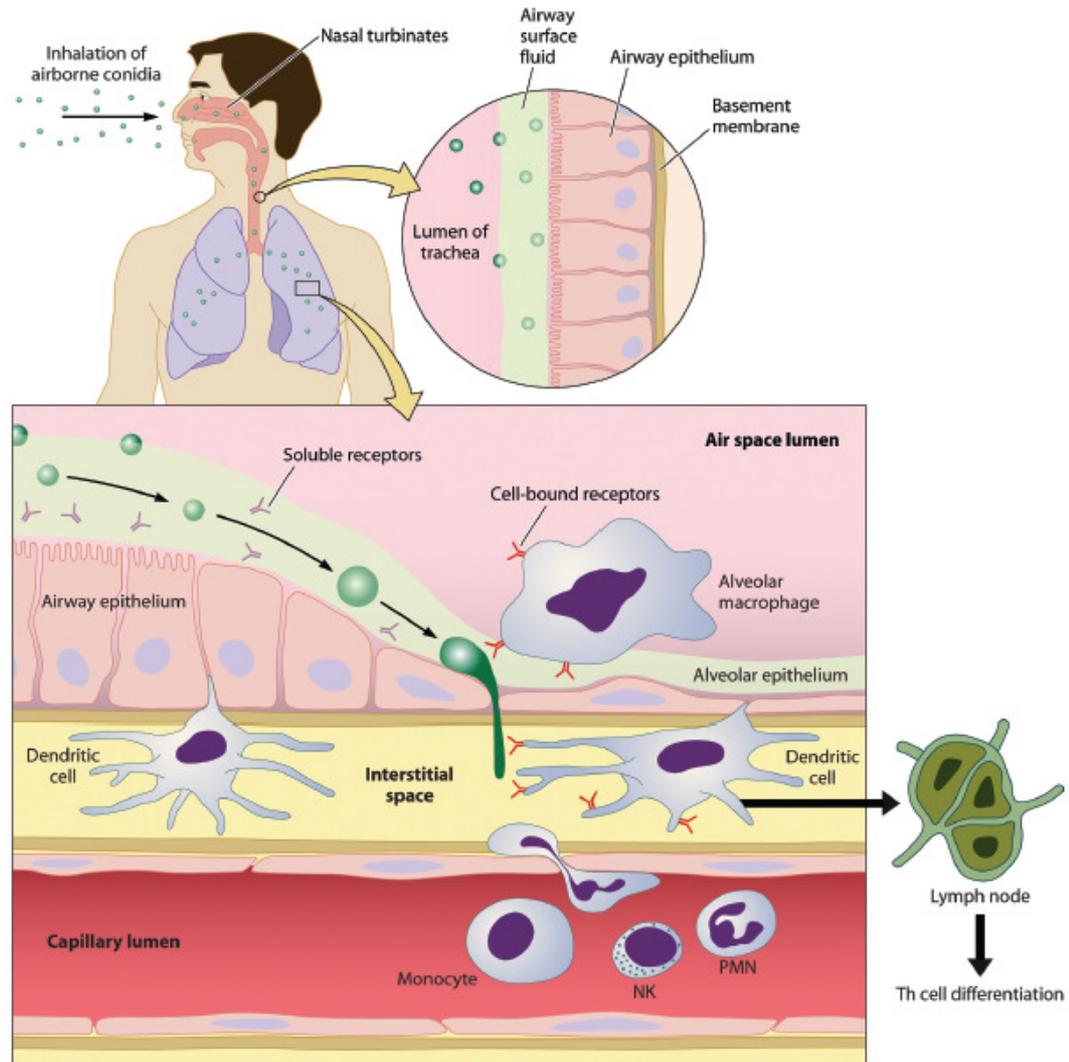
Figura 1. Espectro das doenças causadas por espécies de *Aspergillus* em função da resposta imune do hospedeiro. ABPA, aspergilose broncopulmonar alérgica. **Fonte:** PARK e MEHRAD, 2009.



A aspergilose invasiva (AI) é uma infecção oportunista, sendo a doença e sua progressão resultantes tanto do crescimento e virulência do fungo quanto da resposta do hospedeiro (DAGENAIS, KELLER, 2009).

A primeira linha de defesa aos conídios é representada pelas barreiras físicas do trato respiratório, a começar pelos cornetos nasais e padrão de ramificação da árvore brônquica que fazem com que o fluxo de ar inalado favoreça a deposição dos conídios na superfície fluida do epitélio, onde são sujeitos à remoção por ação dos batimentos ciliares (PARK, MEHRAD, 2009). Além disso, esta superfície fluida possui uma ampla variedade de receptores de reconhecimento de patógenos solúveis e peptídios microbicidas. Aliados a essas defesas são desencadeados mecanismos de resposta imune inata, que incluem a resposta de macrófagos alveolares e células dendríticas, recrutamento de outros leucócitos, e ativação destes no sítio de infecção (PARK, MEHRAD, 2009). Este processo, desde a inalação dos conídios, está demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática dos componentes da resposta imune do hospedeiro ao conídio de *Aspergillus* inalado. PMN, células polimorfonucleares; NK, células *Natural Killer*. **Fonte:** PARK e MEHRAD, 2009.



A partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PMAP) por receptores de reconhecimento de padrão (RRP), tanto os solúveis quanto os expressos na superfície de células das linhagens mielóides (células dendríticas, macrófagos, monócitos e neutrófilos) e não mielóides (células epiteliais e endoteliais) (STEELE, WORMLEY JR, 2012) é iniciada a resposta imune. Entre os receptores se incluem DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*), um receptor do tipo lectina, *dectin-1*, TLR-2 e TLR-4 (*toll like receptors 2 e 4*). Receptores DC-SIGN e *dectin-1* parecem estar envolvidos em mecanismos de fagocitose e morte intracelular mediados por macrófagos alveolares, neutrófilos e células epiteliais; enquanto que o reconhecimento por TLR-2 e TLR-4 medeiam

tanto os mecanismos já citados quanto a morte extracelular mediada por neutrófilos frente aos fenótipos de conídios em germinação e hifas (BALLOY, CHIGNARD, 2009).

Os macrófagos alveolares são primariamente responsáveis pela fagocitose e morte dos conídios assim como pela iniciação da resposta próinflamatória para recrutamento de neutrófilos (DAGENAIS, KELLER, 2009). A eliminação dos conídios por estes macrófagos é altamente efetiva, com 90% dos conídios destruídos em 30h (BALLOY, CHIGNARD, 2009).

É desencadeada uma resposta próinflamatória caracterizada pela produção citocinas e quimiocinas importantes na defesa contra este organismo, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, proteína inflamatória 1 α dos macrófagos, e proteína 1 quimiotática de monócitos (DAGENAIS, KELLER, 2009).

Os conídios de *Aspergillus* passam por diferentes fenótipos até atingirem a forma de hifa no hospedeiro, estes são: latente, intumescido, em germinação e hifa (BALLOY, CHIGNARD, 2009). Os conídios em latência e intumescidos que evadem da ação dos macrófagos podem germinar e se tornam alvo da infiltração por neutrófilos (DAGENAIS, KELLER, 2009). Os neutrófilos constituem a maior população de fagócitos intravasculares e são essenciais na defesa contra infecções microbianas. A rede vascular do pulmão, em especial os capilares, é um importante reservatório dos mesmos, contendo 40% dos neutrófilos do corpo. Durante a infecção estas células são rapidamente recrutadas e podem constituir mais de 90% das células fagocitárias presentes no sítio da infecção (BALLOY, CHIGNARD, 2009). Além de possuir ação contra conídios latentes e intumescidos, os neutrófilos têm um importante papel contra os conídios em germinação e hifas.

Na interação com conídios de *Aspergillus*, monócitos do sangue periférico sofrem profundas mudanças na expressão de centenas de genes. Estas células são capazes de ingerir e matar conídios, além de induzir danos nas hifas. A morte dos conídios neste caso pode ser reforçada em presença GM-CSF, IFN- γ e drogas fungicidas (PARK, MEHRAD, 2009).

Drogas antifúngicas que têm como alvo ou modulam componentes da parede celular fúngica parecem também alterar a resposta inflamatória, a exemplo das equinocandinas, que favorecem a exposição do β -(1,3)-glucana nas hifas de *Aspergillus*, a secreção de maiores níveis de TNF- α e CXCL2 por macrófagos derivados de medula óssea e maior dano da hifa causado por neutrófilos (PARK, MEHRAD, 2009).

Conídios latentes tornam-se intumescidos dentro de 4 a 5 horas após chegada aos pulmões e, se não eliminados, germinam e formam hifas em 12 a 15 horas após chegada. As hifas

podem invadir o tecido pulmonar, causando pneumonia, e frequentemente disseminam para outros órgãos, mais comumente nas regiões laterais ao pulmão e o cérebro (PARK, MEHRAD 2009). A disseminação da infecção ocorre por um processo de angiomas, resultando em trombose e infarto, com criação de uma área necrótica apropriada ao crescimento do fungo (DAGENAIS, KELLER, 2009).

O perfil de citocinas induzido durante a infecção, ao menos em modelo murino, depende do *status* de imunidade (imunocompetente ou imunocomprometido) e o tipo de imunossupressão, neutropenia ou corticoterapia prolongada por exemplo. Geralmente, em camundongos imunocompetentes observa-se a expressão das citocinas TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-18, IL-6, IL-1b, IL-10, GM-CSF, MIP-1a, MCP-1, MIP-2 e KC (BALLOY, CHIGNARD, 2009).

Quando o micro-organismo não é eliminado nas primeiras horas pelas barreiras físicas e mecanismos da imunidade inata, ocorre a apresentação de antígeno e a proliferação de células T *Aspergillus* específicas e é dado início a imunidade adquirida (PARK, MEHRAD, 2009).

Linfócitos tipo Th1, cuja assinatura é a produção de IFN- γ , são necessários para uma efetiva resposta ao *A. fumigatus*. Uma robusta resposta Th1 aumenta a resistência em modelo murino experimental da AI, enquanto que a resposta Th2 leva ao desenvolvimento da aspergilose broncopulmonar alérgica. Além disso, um aumento na produção de citocinas Th1 *versus* Th2 está associada ao melhor desfecho na doença fúngica invasiva (BEN AMI, 2010). Já a resposta Th17 parece favorecer a AI ao mesmo tempo que exacerba o dano tecidual provocado por inflamação (ZELANTE, 2007).

Entretanto, o bloqueio de IL-23 por anticorpos neutralizantes em camundongos deficientes em IFN- γ com AI resultou em uma maior carga fúngica, sugerindo que ao menos na ausência de uma efetiva resposta Th1, a via IL-23/IL-17 é protetora contra infecção por *Aspergillus*.

Prolongada neutropenia é classicamente definida como principal fator de risco para a AI e é frequentemente resultante de terapias altamente citotóxicas como com uso da ciclofosfamida, a qual é utilizada em paciente transplantado ou naqueles com doenças hematológicas (DAGENAIS, KELLER, 2009). Ciclofosfamida é um agente alquilante de DNA que depleta leucócitos, incluindo os neutrófilos.

Uma variedade de pacientes não neutropênicos, mais comumente aqueles sob tratamento com corticosteróides, é susceptível à AI, embora a patologia da doença seja diferente. Estes casos são caracterizados por um limitado desenvolvimento do fungo, com infiltrado piogranulomatoso, necrose tecidual e excessiva inflamação. Corticosteróides causam

significantes consequências não apenas na fagocitose, como também prejudicam mecanismos oxidativos nos fagócitos, produção de citocinas e quimiocinas, e migração celular (DAGENAIS, KELLER, 2009).

Nas últimas décadas houve grande avanço nos conhecimentos sobre a imunopatogênese da aspergilose invasiva, o que tem permitido formular potenciais abordagens que visam aumentar ou restaurar a imunidade antifúngica em pacientes imunocomprometidos. Estas abordagens incluem administração de células efetoras e células regulatórias, como granulócitos, células T específicas, células *natural killer*, células dendríticas; assim como a administração de citocinas recombinantes, interferons e fatores de crescimento; além de várias estratégias vacinais (CARVALHO, 2012; LEHRNBECHER, 2012).

Outra estratégia baseada nos conhecimentos sobre imunopatogênese da AI é a observação dos níveis de citocinas para acompanhamento da resposta ao tratamento. Uma coorte de estudo multicêntrico envolvendo 119 pacientes com AI mostrou que níveis inicialmente muito elevados de IL-8, e persistentemente elevados de IL-6, IL-8 e proteína C reativa após início da terapia podem ser preditores precoces para identificação de não respondedores, enquanto que o decréscimo dos níveis dessas citocinas foi observado durante o tratamento daqueles que tiveram uma boa resposta clínica (CHAI, 2010).

Entretanto, são necessários ainda muitos estudos para avaliar os benefícios dessas abordagens na prática clínica.

2.2 Diagnóstico da aspergilose invasiva e a detecção do antígeno galactomanana

Existe uma grande dificuldade para o estabelecimento do diagnóstico da aspergilose invasiva. Para o diagnóstico definitivo é necessária a visualização de elementos fúngicos nos tecidos obtidos por biópsia ou punção aspirativa com agulha do sítio de infecção. Os exames histológicos requerem procedimentos invasivos e geralmente são excluídos uma vez que os pacientes envolvidos em casos suspeitos são indivíduos debilitados, principalmente aqueles citopênicos submetidos a tratamentos quimioterápicos e em período pós-transplante. A cultura a partir de fluidos biológicos tem baixo rendimento e nem sempre se pode diferenciar se um resultado positivo é referente à doença invasiva, colonização ou contaminação (AQUINO, 2007; DE PAUW, 2008).

Abordagens diagnósticas mais recentes tem se baseado na detecção de marcadores circulantes, antígenos ou constituintes da parede celular fúngica. Estes biomarcadores foram recentemente incluídos como critério micológico em consenso sobre doenças fúngicas

invasivas (DFI) elaborado pela *European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infection Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group* (EORTC/MSG) (ASCIUGLU, 2002, DE PAUW, 2008). Este consenso foi projetado para pesquisa clínica e epidemiológica, podendo ser aplicado à prática clínica, mas nos casos suspeitos a terapia antifúngica deve ser iniciada antes de cumprirem-se os critérios para diagnóstico definitivo (SHERIF, SEGAL, 2010).

O consenso elaborado pelo EORTC/MSG propõe definições padronizadas para o diagnóstico da DFI baseadas em fatores do hospedeiro, critérios clínicos e critérios micológicos, dos quais faz parte a detecção do antígeno galactomanana em plasma, soro, lavado broncoalveolar ou líquido cefalorraquidiano como teste indireto para o diagnóstico da aspergilose invasiva (DE PAUW, 2008). A Tabela 1 reúne as descrições destes critérios levando em conta principalmente a aspergilose pulmonar invasiva. Os níveis de probabilidade atribuídos são: DFI “provada”, “provável” e “possível” em pacientes imunocomprometidos com câncer ou receptores de células tronco hematopoiéticas. Para diagnóstico classificado como possível é necessário um fator do hospedeiro e um critério clínico; para diagnóstico provável devem ser cumpridos estes mesmos critérios e o critério micológico (DE PAUW, 2008).

Tabela 1. Critérios para diagnóstico da doença fúngica invasiva (DFI) em pacientes com câncer e receptores de células tronco hematopoiéticas.

Tipos de critério	Critérios
Fator do hospedeiro	<ul style="list-style-type: none"> • História recente de neutropenia [500 neutrófilos/μL (<500 neutrófilos/mm^3) por mais de 10 dias] • Receptores em transplante de medula óssea alogênico • Uso prolongado de corticosteróides • Tratamento com imunossupressores de células T (como a ciclosporina, bloqueadores de TNF-α, anticorpos monoclonais específicos, ou análogos de nucleosídeos) • Imunodeficiência grave hereditária (como doença granulomatosa crônica ou imunodeficiência grave combinada)
Critério clínico	<ul style="list-style-type: none"> • A presença de um dos três sinais abaixo em tomografia computadorizada de tórax: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Sinal denso, lesão bem circunscrita, com ou sem sinal do halo ✓ Sinal do ar crescente ✓ Cavidade
Critério micológico	<ul style="list-style-type: none"> • Teste direto (citologia, microscopia direta, ou cultura) • Testes indiretos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Aspergilose: antígeno galactomanana detectado em plasma, soro, lavado broncoalveolar, ou líquido cefalorraquidiano ✓ DFI que não cryptococose ou zigomicose: β-D-glucana detectada em soro

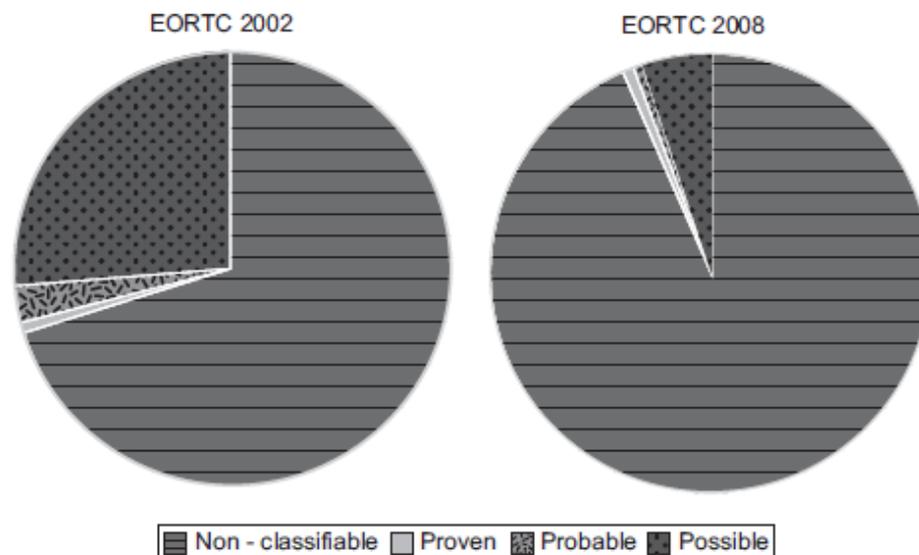
Fonte: Adaptado de DE PAUW, 2008.

O consenso de 2008 é resultado da revisão do consenso de 2002 onde os sintomas relativos à DFI eram levados em conta como critérios para diagnóstico “possível” e “provável”. Com a revisão, os sintomas passaram a ser desconsiderados para classificação, sendo observados apenas achados característicos em tomografia computadorizada de tórax, e apenas um ensaio positivo de detecção de GM tornou-se suficiente como critério micológico, mas utilizado apenas para o diagnóstico “provável”. Pacientes que apresentam fator do

hospedeiro e detecção GM teriam diagnóstico classificado como AI “possível”, mas atualmente representa um episódio não classificável (ASCIOGLU, 2002; DE PAUW, 2008).

Avaliando o impacto da revisão do consenso, foi feita uma análise retrospectiva de um estudo realizado por um período de aproximadamente quatro anos cujos participantes possuíam doenças hematológicas e contabilizaram 589 episódios de risco para desenvolvimento de DFI, onde 175 foram classificados como AI com algum nível de probabilidade. A Figura 3 abaixo representa a reclassificação dos casos a partir do novo consenso e demonstra claramente que a revisão tornou as definições mais objetivas. Dos 155 casos de AI possíveis, 30 permaneceram com a classificação; os 16 casos prováveis teve este número reduzido para 4; e 4 casos provados permaneceram com a mesma classificação uma vez que a demonstração do micro-organismo a partir de biópsia é definitivo para diagnóstico. Dois episódios, que tinham ao menos dois resultados positivos consecutivos de GM tornaram-se não classificáveis (TSITSIKAS, 2011). E como foi relatado que a implantação do teste de detecção do antígeno foi realizada durante o período de quatro anos e que então não foi feito teste para todos os participantes, poderia ser que alguns dos considerados possíveis após consenso 2008 (fator do hospedeiro + achado em TC) tivessem nível de probabilidade elevado para provável (fator do hospedeiro + achado em TC + detecção de GM).

Figura 3. Reclassificação de casos de aspergilose invasiva a partir de critérios revisados pela EORTC/MSG. **Fonte:** TSITSIKAS e cols., 2011.



Para detecção do antígeno GM em fluidos biológicos tem-se comercialmente disponível o imunoenensaio enzimático, do tipo ELISA, Platelia™ *Aspergillus*, BioRad, França, no qual é utilizado o anticorpo monoclonal EB-A2 detectar a GM através do reconhecimento da cadeia lateral 1→5-β-D-galactofuranosídeo da molécula de GM (AQUINO, 2007; PASQUALOTTO, 2005).

O limiar de detecção relatado para este teste em amostras de soro é 1.0 ng/mL⁻¹ (Platelia™ *Aspergillus*, BioRad, France), enquanto que testes de aglutinação em látex usados previamente com o mesmo anticorpo apresentavam um limiar de detecção de 15 ng/mL⁻¹ (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur). Os resultados podem ser obtidos em poucas horas, o que é uma grande vantagem em comparação aos métodos de cultura (PASQUALOTTO, DENNING, 2005; AQUINO, 2007).

Um interessante estudo precursor realizado entre 1997 e 2000 por Maertens e col. (2001) envolveu 362 episódios de alto risco com neutropenia prolongada (<500 neutrófilos/μL por mais de 10 dias) em pacientes com doenças hematológicas e tinha como proposta a validação prospectiva do uso do teste de ELISA para detecção de GM (ELISA-GM). Em todos os casos de AI provada (n=30) foram vistos resultados positivos no teste e nenhum falso negativo foi detectado durante estudo. A galactomananemia precedeu os sinais característicos de DFI em exames de imagem em 19 de 28 pacientes avaliados, com resultados positivos precedendo o achado clínico em até 27 dias. A detecção de GM também antecedeu o diagnóstico definitivo, aqui numa faixa de 2 a 110 dias, mediana de 5 dias. O trabalho concluiu que o teste apresentou nesta população de risco uma sensibilidade de 89,7%, especificidade de 98,1%, valor preditivo positivo em 87,5% e valor preditivo negativo em 98,4%.

O produto de uma metanálise envolvendo diversos estudos, principalmente em indivíduos com doenças hematológicas e transplantados de órgãos sólidos mostrou que o ELISA para detecção de GM apresentou 71% de sensibilidade, 89% de especificidade, e valor preditivo negativo (VPN) entre 95% e 98% (PFEIFFER, 2006). Este alto VPN mostra que resultados negativos no ELISA-GM podem ser usados para excluir o diagnóstico da AI em episódios de risco ou suspeitos da doença infecciosa.

Esta técnica de ELISA para detecção de GM tem sido utilizada por mais de dez anos na Europa, e foi recentemente aprovada para uso nos Estados Unidos da América. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou sua utilização em 2007 (AQUINO, 2007; ANVISA, 2012).

A galactomanana é uma molécula que tem um núcleo não imunogênico, manana, com cadeias laterais imunorreativas contendo unidades de galactofuranosil (LATGE, 1994). Galactomanana é um heteropolissacarídeo estável ao calor liberado da parede celular fúngica durante o crescimento da hifa no tecido (AQUINO, 2007).

O antígeno GM pode ser detectado numa média de 5 a 8 dias antes das manifestações clínicas da aspergilose, podendo também preceder a demonstração de anormalidades nos achados de tomografia computadorizada (TC) (SULAHIAN, 2001). Tem-se demonstrado que o monitoramento prospectivo dos pacientes durante o período de alto risco com dosagem seriada do antígeno auxilia na instituição do tratamento preemptivo, podendo também ser usada para observar sucesso ou falha na terapia (MENNINK-KERSTEN, 2004; MICELI, 2008; SHERIF, SEGAL, 2010; PARK, 2011).

Outro biomarcador sorológico que tem sido usado para auxiliar no diagnóstico da AI, só que neste caso como um “panbiomarcador” por se relacionar com as diversas espécies de fungos filamentosos, é a 1→3-β-D-glucana. O ensaio para detecção da glucana tende a se tornar positivo antes do teste com galactomanana. Embora o uso simultâneo dos testes não melhore a sensibilidade de cada um, a combinação dos testes pode ser usada para confirmar a existência da AI desde que ambos sejam positivos. Já a discrepância na positividade entre os testes pode ajudar a identificar resultados falsos positivos em cada um (FONTANA, 2012; OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Um dos principais fatores associados a falsos negativos neste teste é o uso prévio de antifúngicos com atividade contra espécies de *Aspergillus* (Tabela 2), o qual demonstra diminuir a sensibilidade do ensaio (MIKOLAJEWSKA, 2011). O uso desses agentes pode diminuir os níveis de antígeno a serem detectados pelo fato de diminuírem a carga fúngica, reduzindo assim a utilidade do teste para diagnóstico em pacientes que recebem profilaxia ou terapia empírica (MARR, 2004; MARR, 2005; AQUINO, 2007).

A frequência em que o teste é realizado durante o monitoramento do paciente de risco é também uma questão muito importante. O ideal é que amostras de soro sejam obtidas e testadas duas ou mais vezes por semana, afinal, a GM sérica é transiente e estratégias inadequadas de amostragem pode comprometer a sensibilidade do ensaio (AQUINO, 2007).

Os principais fatores associados aos resultados falsos positivos são o uso de droga de origem fúngica, como ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam e amoxicilina-ácido clavulônico; bacteremia, embora o mecanismo através do qual ocorra ainda não tenha sido elucidado; presença de autoanticorpos na amostra e alguns outros como citados na Tabela 2. A respeito das formulações com antibióticos de origem fúngica estudos mais recentes têm

mostrado que esta parece não ser mais uma fonte de falsos positivos (XAVIER, 2009; MIKULSKA, 2012).

Tabela 2. Fatores associados com resultados falsos negativos e falsos positivos em imunoenensaio enzimático de detecção de galactomanana (ELISA-GM).

Falsos negativos	Falsos positivos
Pacientes não neutropêncos	Uso de antibióticos
Exposição prévia a drogas antifúngicas	Pacientes pediátricos e neonatos
<i>Cutt-off</i> muito elevado	Infecções causadas por <i>Penicillium</i> spp.
Critério diagnóstico inapropriado	Hemodiálise
Baixa frequência de testes	Autoanticorpos
Pequeno volume de amostra	Bacteremia
Estocagem de amostra por longo período	Colonização das vias aéreas por <i>Aspergillus</i> spp.

Fonte: Adaptado de AQUINO, 2007.

Além de *Aspergillus* outros gêneros de fungos podem também liberar galactomanana durante seu crescimento, especialmente espécies de *Penicillium*. Já as demais espécies parecem liberar este antígeno em magnitude consideravelmente menor (AQUINO, 2007).

O espectro das doenças fúngicas mais frequentes entre pacientes com doenças hematológicas compreende: aspergilose, candidíase, fusariose, zigomicoses, scedosporidiose, tricosporonose. Dentre essas a fusariose deve ser levada em consideração no momento de interpretação de resultados em ELISA-GM, uma vez que espécies de *Fusarium* são potenciais causadoras de resultados falsos positivos (MIKOLAJEWSKA, 2012).

Por fim, a importância do teste se dá não apenas para diagnóstico precoce e elevação do nível de probabilidade do diagnóstico, como também para monitoramento da terapia antifúngica instituída, pois geralmente o curso dos índices corresponde à resposta ao tratamento, uma vez que a redução da carga fúngica se relaciona com a redução dos níveis de GM (MICELI, 2008, PARK, 2011).

2.3 Aspectos epidemiológicos da aspergilose invasiva

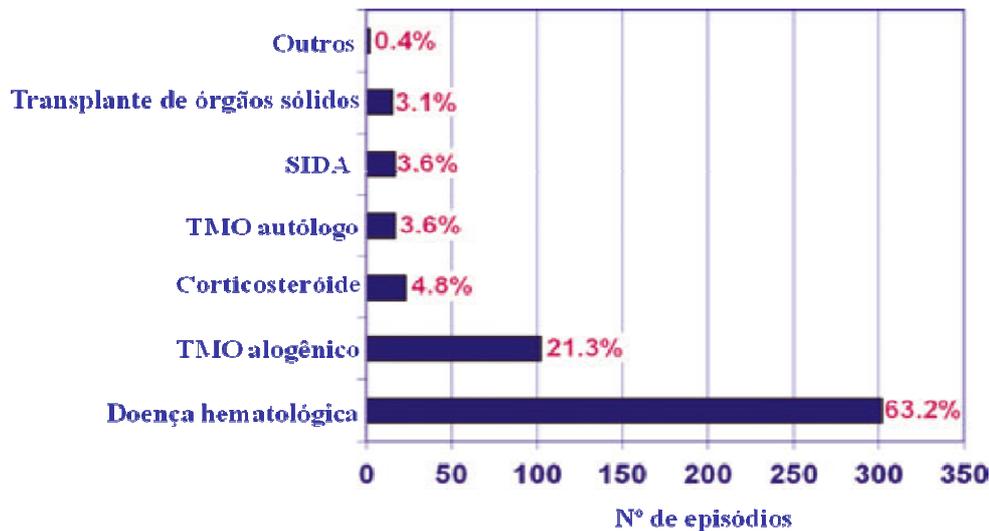
Entre as mais de 180 espécies reconhecidas do gênero *Aspergillus*, *A. fumigatus* permanece a causa mais comum de doenças humanas, seguida de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* (DAGENAIS, KELLER, 2009; PARK, MEHRAD, 2009).

Na última década se notou mudanças na epidemiologia das infecções fúngicas oportunistas. As infecções causadas por fungos filamentosos têm sido cada vez mais associadas com alta mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Estas mudanças provavelmente se devem ao uso profilático do fluconazol e outros antifúngicos como prática clínica adotada ao longo do tempo e a introdução de novos tratamentos mais agressivos quanto à indução de imunossupressão (CÁSTON-OSORIO, 2008; ARAUJO, BEIRÃO, 2012).

Confirmando a importância que têm ganhado as infecções por fungos filamentosos entre pacientes imunossuprimidos, durante um período de cinco anos (2001-2006), Kontoyiannis e cols. (2010) descreveram 983 casos de infecções fúngicas entre 875 transplantados de medula óssea, e observou que 43% das infecções foram causadas por *Aspergillus* spp., 28% por *Candida* spp., e 8% por Mucorales. O estudo foi desenvolvido nos Estados Unidos da América.

Apesar das eficazes estratégias terapêuticas, a aspergilose é a doença fúngica invasiva mais comum em receptores de transplante de medula óssea (TMO) alogênico e pacientes submetidos à quimioterapia de indução e consolidação em leucemia aguda (PAGANO, 2006; KONTOYIANNIS, 2010). A Figura 4 mostra as condições de base mais frequentes para AI, com as doenças hematológicas e TMO representando mais de 90% das condições predisponentes primárias. Entre as doenças hematológicas, elevadas incidências são observadas para leucemia mielóide aguda, seguida de leucemia linfóide aguda e mieloma múltiplo (HERBRECHT, 2011).

Figura 4. Distribuição das condições primárias predisponentes para aspergilose invasiva em ensaio do voriconazol e em ensaio do Ambiload (total de pacientes = 478). **Fonte:** HERBRECHT e cols., 2012.



Os principais fatores relacionados às condições de base que elevam o risco de adquirir aspergilose invasiva são: neutropenia, câncer progressivo, doença enxerto versus hospedeiro, tipos de quimioterapia para câncer, uso de imunossuppressores de células T (HERBRECHT, 2012). O risco de infecção invasiva é diretamente proporcional à duração da neutropenia e pode chegar a ocorrer em até 70% dos casos após 34 dias de granulocitopenia (KEDZIERSKA, 2007).

Alguns fatores ambientais também parecem influenciar no risco de infecção por *Aspergillus* spp. com relação às condições de base, por exemplo: clima da região, construções e reformas, local de residência, comidas contaminadas, plantas, jardinagem, ambientes sem filtro de ar HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) durante internamento hospitalar (HERBRECHT, 2012).

Uma vez que a inalação de conídios representa a rota usual para início da infecção invasiva em pacientes imunossuprimidos, alguns estudos tem mostrado a relação epidemiológica entre a presença de *Aspergillus* spp. no ambiente e a ocorrência da aspergilose invasiva nosocomial. Uma análise feita em unidade de transplante de medula óssea e enfermarias de hematologia mostrou uma significativa relação entre a incidência de AI e grau de contaminação fúngica do ar e superfícies em quartos convencionais (sem filtro HEPA) e lugares comuns, como corredores e estações de enfermagem em hospital na França (ALBERTI, 2001). Já nos Estados Unidos foi relatado um surto de AI em um serviço de

oncologia e hematologia durante um semestre (10 de 55 pacientes admitidos) após o qual foram instalados filtros HEPA como medida preventiva da infecção no serviço e então nos dois anos seguintes apenas dois casos foram notificados (HAHN, 2002). O impacto do uso de filtros HEPA também foi observado em um hospital localizado em Singapura onde a taxa de incidência de AI reduziu de 34,61/ 100.000 para 17,51/ 100.000 comparando-se períodos pré e pós instalação dos filtros (SALAM, 2010).

Entre dezembro de 2006 e abril de 2008 foi detectado um surto de AI em unidade de terapia intensiva de cirurgia de coração de grande porte em hospital na Espanha com notificação de sete casos provados ou prováveis. A partir de um programa de controle ambiental de salas de cirurgia e unidades de terapia intensiva (UTI) foi observado que pré e pós surto nenhum fungo filamentoso foi detectado no ambiente e nenhum caso de AI foi documentado. Porém, durante o surto foram detectados níveis anormais de unidades formadoras de colônia por m³ de ar nas UTI e houve correspondência genotípica entre isolados do ambiente e isolados clínicos em 3 de 6 casos causados por *Aspergillus fumigatus* (PELÁEZ, 2012). Este estudo reforçou a importância do controle ambiental na prevenção de DFI em ambiente hospitalar.

São poucos os dados epidemiológicos encontrados no Brasil sobre a aspergilose invasiva. Durante o período de 1993 a 1998 foram relatados 5 casos de doenças invasivas por fungos filamentosos entre 64 receptores de TMO em dois hospitais em São Paulo, duas dessas causadas por *Aspergillus* spp. (OLIVEIRA, 2002).

Em 2012 foi publicado o primeiro estudo epidemiológico multicêntrico de DFI em pacientes com doenças hematológicas do Brasil. Este foi uma coorte envolvendo oito centros localizados em sete cidades do sul e sudeste do país no período de 2007 a 2009, onde todos os receptores de células tronco hematopoiéticas (378 alogênicos / 322 autólogos) foram acompanhados até um ano pós transplante e todos pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) ou síndrome mielodisplásica (SMD) foram acompanhados até final da quimioterapia de consolidação (n=237). As DFI provadas ou prováveis mais frequentes foram fusariose (n=23), aspergilose (n=20) e candidíase (n=11); e calculada a incidência cumulativa de um ano para aspergilose invasiva foram encontrados os valores de 13,4% para LMA/SMD, 2,3% para transplantes alogênicos e 0% para transplantes autólogos. Uma limitação apontada pelo próprio estudo foi o fato do teste de GM não ter sido realizado rotineiramente para uma parte do período de coleta de dados, podendo a incidência de AI ter sido subestimada por este motivo (NUCCI, 2012).

Em pacientes com leucemia aguda a AI ocorre em 5% a 24% dos casos, com taxas de mortalidade entre 30% e 40%, enquanto entre receptores de TMO a incidência é de aproximadamente 10% e mortalidade de 60%; em transplantado de órgãos sólidos a DFI ocorre em 11% a 14% dos casos, com similar taxa de mortalidade (MASCHMEYER, 2007; SEGAL, 2009).

2.4 Estratégias antifúngicas para a aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos

Os compostos indicados para o tratamento da aspergilose invasiva são: voriconazol como terapia primária e anfotericina B, caspofungina, micafungina, posaconazol e itraconazol como drogas para terapia alternativa (WALSH, 2008).

Voriconazol é um antifúngico pertencente à classe dos triazóis e sua ação ocorre sobre a biossíntese do ergosterol por meio da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase dependente do citocromo fúngico P450, o que resulta em função alterada da membrana celular e conseqüente morte, ou inibição do crescimento e reprodução celular. A droga pode ser formulada em comprimidos ou solução em sulfobutiléter-ciclodextrina para administração intravenosa (WALSH, 2008).

O perfil de reações adversas do voriconazol inclui distúrbios visuais transitórios; hepatotoxicidade (manifestada por níveis elevados de bilirrubina, fosfatase alcalina e aminotransferases hepáticas); erupções cutâneas; alucinações visuais; entre outras (BOUCHER, 2004).

A resistência aos triazóis anti-*Aspergillus* não tem sido muito comum; entretanto, tem-se observado a emergência de resistência ao voriconazol especialmente por isolados da espécie *Aspergillus fumigatus*, principal agente da aspergilose invasiva. Embora a prevalência de resistência relatada em alguns países seja baixa, existe o risco da subnotificação pelo fato da maioria dos laboratórios de microbiologia clínica não monitorarem a resistência rotineiramente e não realizarem teste de concentração inibitória mínima (SNELDERS, 2011; VAN DER LINDEN, 2009; MAYR, LASS-FLÖRL, 2011).

Itraconazol está licenciado para tratamento da aspergilose invasiva em pacientes refratários ou que apresentam intolerância ao tratamento antifúngico padrão. Já o posaconazol está aprovado para a prevenção da aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos, que estão recebendo quimioterapia para indução da remissão de leucemia mielóide aguda ou síndrome mielodisplásica e para receptores de células tronco hematopoiéticas com doença enxerto *versus* hospedeiro (WALSH, 2008).

Anfotericina B (AMB) é um antibiótico macrolídeo poliênico natural que atua principalmente por meio da ligação ao ergosterol, com um segundo mecanismo que pode envolver dano oxidativo da célula através de uma cascata de reações oxidativas ligadas à lipoperoxidação da membrana celular. Exerce atividade *in vitro* e *in vivo* contra a maioria das espécies de *Aspergillus*, mas a maioria dos isolados de *A. terreus* é resistente à droga *in vitro*, *in vivo* e em pacientes. Não é absorvido por via oral e para o uso intravenoso é solubilizado com desoxicolato como suspensão micelar (D-AMB) (WALSH, 2008).

O D-AMB pode causar reações agudas relacionadas à infusão, que incluem febre, calafrios, mialgias, artralgias, náusea, vômito, cefaleia; e nefrotoxicidade dose limitante, caracterizada por azotemia, perda urinária de potássio e magnésio, acidose tubular renal e comprometimento da capacidade de concentração urinária. Já as formulações lipídicas da anfotericina B têm uma nefrotoxicidade reduzida e, portanto permitem a infusão de doses mais altas da droga (WALSH, 2008).

Casposfungina e micafungina são os outros antifúngicos recomendados para tratamento alternativo da aspergilose invasiva. Tratam-se de equinocandinas, uma nova classe de lipopeptídeos anfifílicos semi sintéticos, que atuam por inibição não competitiva da síntese de 1,3- β -glucano, um polissacarídeo da parede celular de muitos fungos patogênicos. Juntamente com a quitina as fibrilas de glicano são responsáveis pela resistência e formato da parede celular fúngica e são importantes tanto na manutenção da integridade osmótica e quanto na divisão e crescimento (WALSH, 2008).

A casposfungina é indicada em pacientes com AI provada ou provável, refratária ou que não toleram outras terapias aprovadas (WALSH, 2008).

Devido às dificuldades para diagnóstico da doença fúngica invasiva por fungos filamentosos, a terapia antifúngica empírica permanece como padrão de cuidado em pacientes neutropênicos com febre persistente (TAN, 2011; MIKOLAJEWSKA, 2012). Assim, até 40% a 50% da população neutropênica de risco pode ser tratada com antifúngicos, quando na verdade a doença fúngica invasiva por filamentosos parece ocorrer em 10% a 15% (MAERTENS, 2005).

Uma nova estratégia tem sido proposta como alternativa à terapia empírica para os pacientes neutropênicos febris, a terapia preemptiva. Nesta estratégia o uso do antifúngico é iniciado apenas quando detectado um marcador laboratorial da infecção, que para a AI são antígeno galactomanana (GM) e β -D-glucana (BDG), podendo ser combinados com sinais radiológicos da DFI. Esta abordagem segue o modelo da terapia preemptiva da infecção por

citomegalovírus (CMV) em transplantados de órgãos sólidos e receptores de células tronco hematopoiéticas, no qual o marcador utilizado é o antígeno pp65 (KALIL, 2005; TAN, 2011).

Com o objetivo de avaliar a viabilidade da estratégia preemptiva baseada na combinação de ensaios de detecção de GM e exames de tomografia computadorizada (TC), Maertens e colaboradores fizeram um estudo prospectivo envolvendo 136 episódios de neutropenia em pacientes com leucemia mielóide aguda ou síndrome mielodisplásica em hospital na Bélgica durante um ano (2003-2004). Faziam parte da avaliação diagnóstica: TC, análise de lavado broncoalveolar quando lesões vistas em TC, e monitoramento diário com testes de GM em plasma. Apenas pacientes com detecção de GM positiva ou testes microbiológicos positivos, relacionados com sinais em TC, foram submetidos a tratamento com anfotericina B. Ocorreu febre em 117 episódios, dos quais ao menos 41 (35%) preenchiavam os critérios para terapia antifúngica empírica. Porém, com o protocolo implantado para o estudo o uso do antifúngico foi reduzido de 35% para 7,7%; e a terapia antifúngica pôde ser iniciada antecipadamente em 10 episódios que não tinham suspeita clínica para DFI. Nenhum caso de AI “não detectado” foi identificado, e a terapia preemptiva mostrou reduzir a utilização de drogas dispendiosas e potencialmente tóxicas.

Um estudo mais recente chegou à mesma conclusão do trabalho acima citado, e ao comparar os dois “braços” da pesquisa separados randomicamente e submetidos às distintas abordagens (empírica e preemptiva) concluiu-se que a nova estratégia proposta não comprometeu a sobrevida dos pacientes neutropênicos persistentemente febris. No braço da abordagem preemptiva os indivíduos foram submetidos ao monitoramento com a realização de teste de GM em amostras de soro duas vezes por semana; o uso de caspofungina, anfotericina B ou voriconazol (CAV) foi iniciado quando dois resultados positivos consecutivos em GM ou apenas um resultado positivo associado a sinais sugestivos de DFI em TC de tórax. A taxa de sobrevida de doze semanas foi de 85,2% no grupo de terapia preemptiva e 84% no grupo de terapia empírica (TAN, 2011).

Além de uma boa ferramenta para guiar a abordagem preemptiva, os resultados de imunoenaios enzimáticos para detecção do antígeno GM em amostras de soro têm mostrado excelentes correlações com desfecho da AI, e assim é também indicada a realização do teste para o monitoramento de tratamento.

Em uma revisão de literatura foi avaliada a força da correlação entre os índices de GM (IGM) e o desfecho da AI utilizando o coeficiente de correlação kapa. Foram analisados 27 estudos envolvendo 257 pacientes com doenças hematológicas de base e AI provada ou provável onde foi feita dosagem sorológica seriada do antígeno GM. O coeficiente de

correlação entre IGM, dentro de uma semana antes do desfecho, e sobrevida (sobrevida *vs.* morte) foi de 0,8737; entre IGM e desfecho geral (sobrevida *vs.* morte, incluindo achados de autópsia) foi 0,9123; e entre IGM e achados em autópsia foi 0,8498. Estes altos valores de coeficiente de correlação tiveram intervalo de confiança (IC) de 95% e $p < 0,001$. A revisão comprovou que o IGM é um bom marcador de desfecho da AI em pacientes com doenças hematológicas (MICELI, 2008).

A aplicação do uso de testes seriados para detecção de GM na avaliação do desfecho clínico da AI foi confirmada através da análise retrospectiva de 58 episódios de neutropenia em pacientes com leucemias agudas que foram diagnosticados como casos de AI. Houve um coeficiente de correlação κ de 0,663 (IC: 95%) entre a cinética dos níveis de GM e desfecho (sobrevida ou morte) na sexta semana; e uma força de correlação ainda maior ao se analisar a décima segunda semana, com coeficiente de correlação κ de 0,819 (IC: 95%). A sobrevida foi significativamente melhor entre aqueles que tiveram os níveis de GM reduzidos em comparação com aqueles que mostraram esses níveis persistentemente acima do ponto de corte (índice de densidade ótica acima de 0,5) ($p < 0,0001$) (PARK, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a incidência de aspergilose pulmonar invasiva em pacientes com doenças hematológicas em episódios de neutropenia acompanhados pelo Serviço de Hematologia / Oncologia do Complexo do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), estado da Bahia, no período de 14 meses.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a incidência da doença pulmonar invasiva por *Aspergillus* spp. entre os episódios de neutropenia durante o período de 14 meses.
- Monitorar pacientes com doenças hematológicas durante episódios de neutropenia através da detecção seriada do antígeno galactomanana em amostras de soro.
- Avaliar a implantação de um protocolo de detecção precoce da aspergilose invasiva baseada no uso do imunoenensaio ELISA-GM e nos dados clínicos dos pacientes.

- Analisar a reprodutibilidade dos resultados positivos no teste ELISA-GM em repetições com mesma amostra de soro.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

O estudo foi do tipo coorte prospectivo onde a população foi composta por episódios de neutropenia em pacientes com doenças hematológicas malignas. Todos os pacientes estiveram sob acompanhamento do Serviço de Hematologia / Oncologia do Complexo do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Universidade Federal da Bahia (UFBA). O período do trabalho foi de maio de 2011 a julho de 2012.

Foram realizadas coletas seriadas de amostras de sangue em tubos de sistema a vácuo de 5 mL sem anticoagulante e com gel separador (BD Vacutainer® SST™) em cada episódio de neutropenia. Os técnicos que realizaram as coletas foram instruídos a não destampar os tubos de coleta a fim de evitar contaminação da amostra. Após coleta as amostras foram refrigeradas a temperatura em torno de 5°C e enviadas o mais breve ao laboratório do Serviço de Imunologia das Doenças Infecciosas (SIDI), localizado na Faculdade de Farmácia da UFBA.

No laboratório as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos para separação do soro.

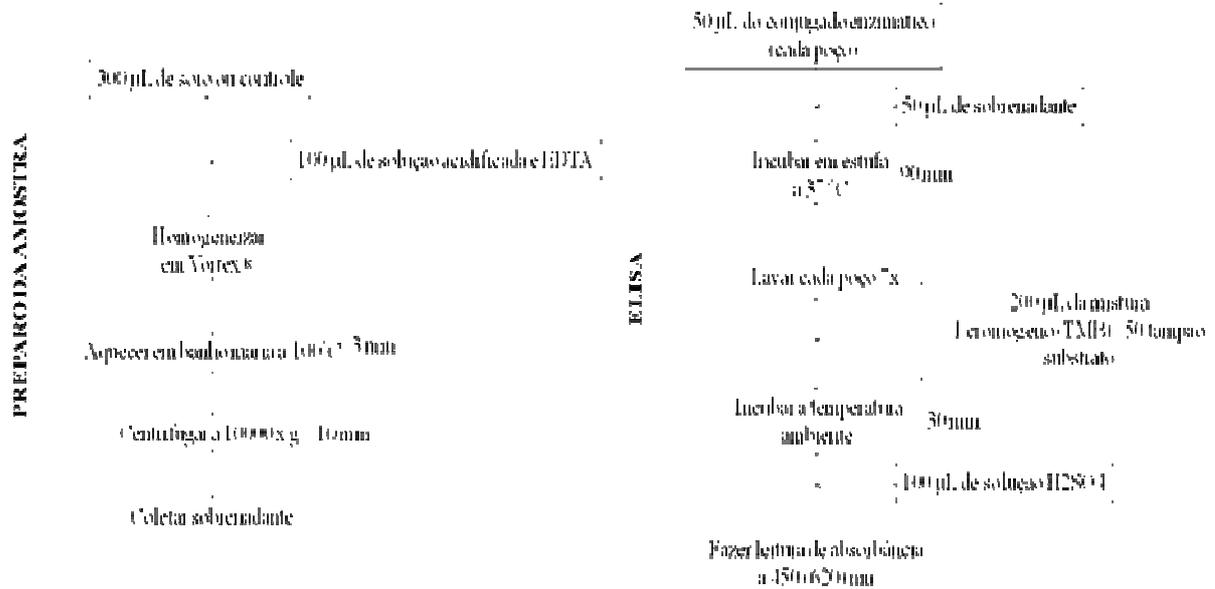
Todo o procedimento de manipulação das amostras de soro foi realizado em cabine de fluxo laminar vertical com filtro HEPA. Este procedimento inclui: alíquota de amostras de soro; mistura de soro com reagente para preparo da amostra; pipetagem da amostra preparada em poços de placa de ELISA para detecção do antígeno galactomanana.

Para cada coleta de amostra foi preenchida pelos médicos uma ficha a respeito de características gerais e clínicas de cada paciente, incluindo os dados variáveis a cada coleta, como valor da contagem de neutrófilos, uso de antifúngicos, uso de alguns antibióticos e sintomas relacionados a doenças fúngicas invasivas. A ficha para solicitação da dosagem de galactomanana (APÊNDICE A) foi formulada para este estudo com a finalidade de coletar informações úteis para avaliação dos episódios e de potenciais interferentes no desempenho da técnica de ELISA para detecção de galactomanana.

A metodologia utilizada para detecção do antígeno foi imunoensaio enzimático do tipo ELISA sanduíche e seguiu as instruções de uso e critérios de validação recomendados pelo

fabricante do kit Platelia™ *Aspergillus*, BioRad, França. A Figura abaixo representa o fluxograma da técnica.

Figura 5. Fluxograma do procedimento de preparo da amostra de soro e técnica de ELISA utilizando o kit Platelia™ *Aspergillus*, BioRad, França.



O preparo das amostras de soro foi realizado em tubos do tipo Eppendorf de 1mL, os quais foram totalmente cobertos e vedados com fita plástica adesiva antes do aquecimento em banho maria a 100°C; para obtenção de sobrenadante foi utilizada centrifuga para microtubos modelo 5804R da Eppendorf, onde a velocidade de rotação usada equivalente a 10000 x g foi de 11500 RPM. As lavagens e leituras das reações foram processadas na lavadora de placa de ELISA STAT FAX – 2600 e leitora de ELISA STAT FAX – 2100 (Awareness Technology Inc), respectivamente.

Os controles foram fornecidos pelo kit: amostras controle negativo e controle positivo, e amostra *cut off*. O resultado de cada teste foi dado em índice de densidade ótica (D.O.) e calculado pela fórmula: D.O. da amostra do paciente / D.O. da amostra *cut off*. Foram considerados resultados positivos aqueles com índice $\geq 0,5$.

A equipe médica foi informada de todos os resultados dos testes de galactomanana a medida que se desenvolvia o estudo.

Para analisar os níveis de probabilidade de diagnóstico de aspergilose invasiva, além dos resultados dos testes de detecção de galactomanana, foi observada a ocorrência ou não de ao menos um dos três sinais característicos de doença fúngica invasiva em tomografia computadorizada (TC) de tórax: sinal denso, lesão bem circunscrita, com ou sem sinal do

halo; sinal de ar crescente; ou cavidade. Informações que também foram requisitadas nas fichas solicitação dos testes (APÊNDICE A).

A TC de tórax foi realizada em casos de segunda troca de antibióticos ou na presença de sintomas respiratórios. O exame foi repetido quando surgimento de novo sintoma respiratório ou quando paciente persistiu febril.

4.2 Critérios de inclusão e de exclusão

Critérios de inclusão:

- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Ter diagnosticada doença hematológica maligna;
- Apresentar neutropenia (< 500 células/ μL);
- Estar sob acompanhamento do Serviço de Hematologia do Complexo HUPES.

Critérios de exclusão:

- Não ter assinado o TCLE;
- Contagem absoluta de neutrófilos acima de 500 células/ μL ;
- Não estar sob acompanhamento do Serviço de Hematologia do Complexo HUPES;
- Realização de apenas um teste para detecção do antígeno GM durante a neutropenia.

4.3 Análises estatísticas

O protocolo de estudo de seguimento ou *follow-up*, estudo prospectivo, foi avaliado para obtenção de medidas de incidência, através da abordagem de hipóteses etiológicas e, por conseguinte, medidas diretas de risco em população comprovadamente exposta a fatores de risco supostos como causa de doença a ser detectada no futuro (LILIENFELD, 1976). Os dados obtidos serão tabulados para obtenção de medidas de centralidade e dispersão e outras estimativas para definição do tipo de dispersão dos dados. Para confirmação e escolha dos testes estatísticos entre paramétricos e não-paramétricos, foi aplicado o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, tendo como nível de significância $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%, análise mono ou bi-caudal. Os dados foram inseridos em tabelas de contingência tipo 2×2 ou $r \times s$, para avaliação das diversas variáveis e medidas de associação.

Os dados após análise foram significantes, se e somente se, inferiores ao nível de significância estabelecido para I.C. de 95%, ou seja, $p < 0,05$. Os programas estatísticos utilizados foram IBM SPSS Statistics 20.0 e GraphPad Prism 5.

4.4 Considerações éticas

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos – UFBA (Protocolo nº 027/09) (APÊNDICE B). Foi elaborado e aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE C) para esta pesquisa e todos os participantes foram voluntários após esclarecimentos sobre os objetivos do trabalho.

A coleta de sangue foi realizada por profissionais da área de saúde habilitados para tal. Os materiais utilizados foram sempre descartáveis. A coleta de sangue não ofereceu riscos, a não ser a possibilidade de sangramento e formação de hematoma, o que é raro e pode ser contornado com compressão do local.

5. RESULTADOS

5.1 Características gerais e clínicas dos episódios de neutropenia / pacientes participantes do estudo

No período de maio de 2011 a julho de 2012 foi incluído no estudo um total de 102 episódios, que correspondeu a 64 pacientes. Cada paciente participou do estudo em média duas vezes (ou seja, média de dois episódios de neutropenia por paciente), sendo que a maioria (42 pacientes) participou do estudo uma só vez. Aqueles que apresentaram mais episódios de neutropenia durante o trabalho, três ou quatro vezes, tinham como doença de base leucemia linfóide aguda e leucemia mielóide aguda. As principais características gerais e clínicas correspondentes à população estudada estão resumidas nas Tabelas 3 e 4.

Quarenta e nove episódios foram excluídos do estudo, pois foi coletada apenas uma amostra para estes, não caracterizando assim o monitoramento que este trabalho propõe. Os dados demográficos destes episódios estão no ANEXO A.

Tabela 3. Características gerais dos episódios de neutropenia monitorados durante o estudo.

Características	Nº
Total	102
Idade	
Média	37
Mediana (faixa)	34 (17 - 74)
Sexo	
Masculino	53 (52%)
Feminino	49 (48%)
Doença de base	
LMA	26 (25,5%)
LLA	24
LMC	3
LLC	2
LH	5
LNH	8
MM	17
Outra	17
TMO	
Autólogo	19
Alogênico	8
Status da doença	
Remissão	52
Recidiva	49
Fase atual da quimioterapia	
Indução	67
Consolidação	32
Doença enxerto <i>versus</i> hospedeiro	4
Dias de neutropenia ao início do monitoramento	
Média	4
Mediana (faixa)	3 (1 - 32)
Dias de neutropenia ao final do monitoramento	
Média	12
Mediana (faixa)	10 (3 - 51)
Febre durante o episódio	
Sim	63
Não	39
Uso prolongado de corticosteróide	9

LMA, leucemia mielóide aguda; LLA, leucemia linfóide aguda; LMC, leucemia mielóide crônica; LLC, leucemia linfóide crônica; LH, linfoma de Hodgking; LNH, linfoma não Hodgking; MM, mieloma múltiplo.

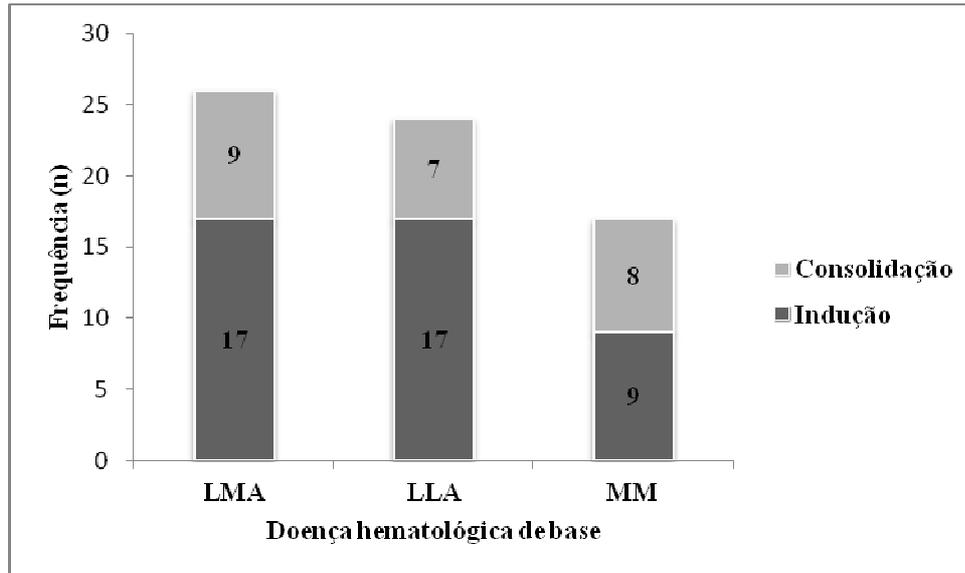
Tabela 4. Características gerais dos pacientes participantes do estudo.

Características	Nº
Nº total	64
Idade	
Média	38
Mediana (faixa)	36 (17 - 74)
Sexo	
Masculino	32
Feminino	32
Doença de base	
LMA	13
LLA	10
LMC	3
LLC	1
LH	4
LNH	5
MM	13
Outras	15
Episódios de neutropenia / paciente	
Média	2
Mediana (faixa)	1 (1 - 5)

LMA, leucemia mieloide aguda; LLA, leucemia linfóide aguda; LMC, leucemia mieloide crônica; LLC, leucemia linfóide crônica; LH, linfoma de Hodgking; LNH, linfoma não Hodgking; MM, mieloma múltiplo.

As doenças hematológicas de base mais frequentes foram leucemia mielóide aguda, leucemia linfóide aguda e mieloma múltiplo. A distribuição das fases de quimioterapia, se indução ou consolidação da remissão, de acordo com essas principais doenças de base estão expressas no gráfico da figura 6.

Figura 6. Frequência das principais doenças de base e distribuição das fases de quimioterapia.



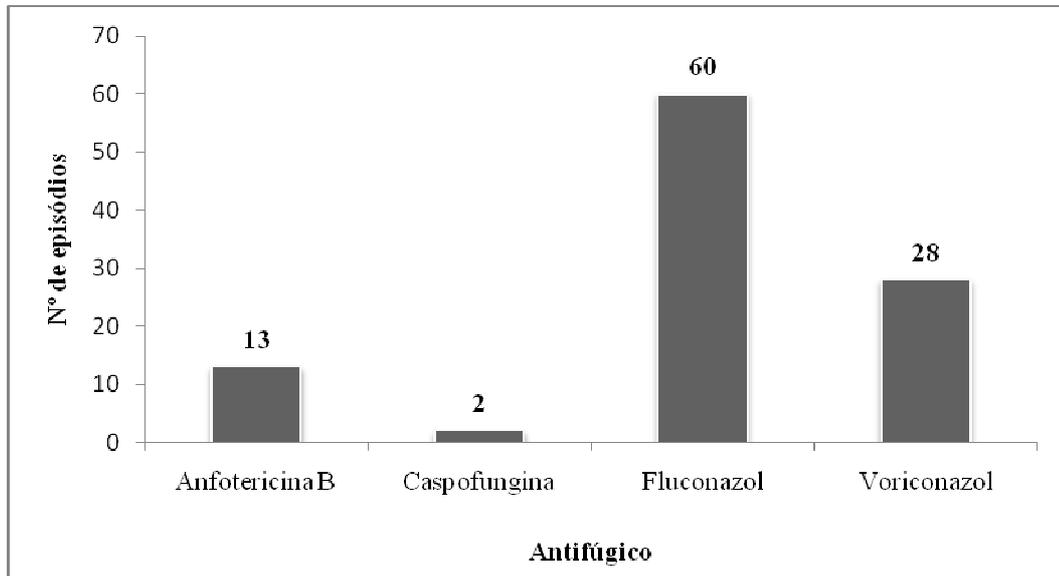
Quanto a outras condições de base predisponentes ao desenvolvimento da AI foi relatada síndrome da imunodeficiência adquirida em 6 episódios; uso prolongado (> três semanas) de corticosteróides nos últimos 60 dias em 9 episódios; e o uso de análogos de nucleosídeos durante os últimos 90 dias em 10 episódios.

Não foram relatadas outras imunodeficiências.

Um total de 307 amostras foi testado durante o período, com uma média de três amostras por episódio (mediana = 3, mínimo = 2; máximo = 7).

A figura 7 mostra a frequência na utilização de antifúngicos entre os episódios estudados. Voriconazol foi o segundo mais utilizado durante o trabalho, em um total de 28 episódios. Seu uso mais frequente foi entre casos de LMA como doença de base, um total de 12 (10 em fase de indução e 2 em consolidação), seguido da LLA, com sua administração em 9 casos (7 em fase de indução e 2 em consolidação).

Figura 7. Frequência da utilização de antifúngicos entre os episódios de neutropenia monitorados.



Entre os 28 episódios em que foi utilizado o voriconazol, 20 tinham apresentado febre e três tinham ao menos um sintoma que pudesse estar relacionado a DFI.

Entre os 17 casos de MM este antifúngico foi indicado em apenas um caso e seu uso foi iniciado após primeiro resultado positivo de detecção de GM.

A tabela 5 demonstra os resultados de uma relação entre o uso ou não do voriconazol e os resultados em ensaio de detecção de GM entre todos os episódios de neutropenia febril. A proporção de episódios com resultados positivos entre aqueles que usaram a droga foi de 20,0% (4/20) e entre aqueles que não usaram foi de 13,9% (6/43) ($p=0,7126$, teste de Fisher).

Tabela 5. Uso de voriconazol *versus* resultados em ensaios de detecção de GM em total de episódios de neutropenia febril (n=63).

Voriconazol	Resultados em ensaios de detecção de GM		Total
	Negativo	Positivo	
Não	37	6	43
Sim	16	4	20
Total	53	10	63

Como tem-se apontado os antibióticos de origem fúngica como potenciais causadores de resultados falsos positivos em testes de GM, foram analisadas as relações entre uso da formulação piperacilina-tazobactam e resultados positivos em ensaio de detecção de GM no total de episódios febris (n=63) (Tabela 6) e total de episódios envolvidos no estudo (n=102) (Tabela 7).

Comparando-se as proporções de episódios com testes positivos entre aqueles que não usaram a formulação e aqueles que usaram na população referente a tabela 6 tem-se: 14,6% (6/41) e 18,2% (4/22) ($p=0,7291$); e na população referente a tabela 7 tem-se: 15,6% (12/77) e 16,0% (4/25) ($p=1,00$), respectivamente.

Apenas em um episódio foi utilizado amoxicilina-ácido clavulônico e em nenhum foi usado ampicilina-sulbactam.

Tabela 6. Uso de piperacilina-tazobactam *versus* resultados em ensaios de detecção de GM em total de episódios de neutropenia febril (n=63).

Piperacilina-tazobactam	Resultados em ensaios de detecção de GM		Total
	Negativo	Positivo	
Não	35	6	41
Sim	18	4	22
Total	53	10	63

Tabela 7. Uso de piperacilina-tazobactam *versus* resultados em ensaios de detecção de GM em total de episódios de neutropenia envolvidos no estudo (n=102).

Piperacilina-tazobactam	Resultados em ensaios de detecção de GM		Total
	Negativo	Positivo	
Não	65	12	77
Sim	21	4	25
Total	86	16	102

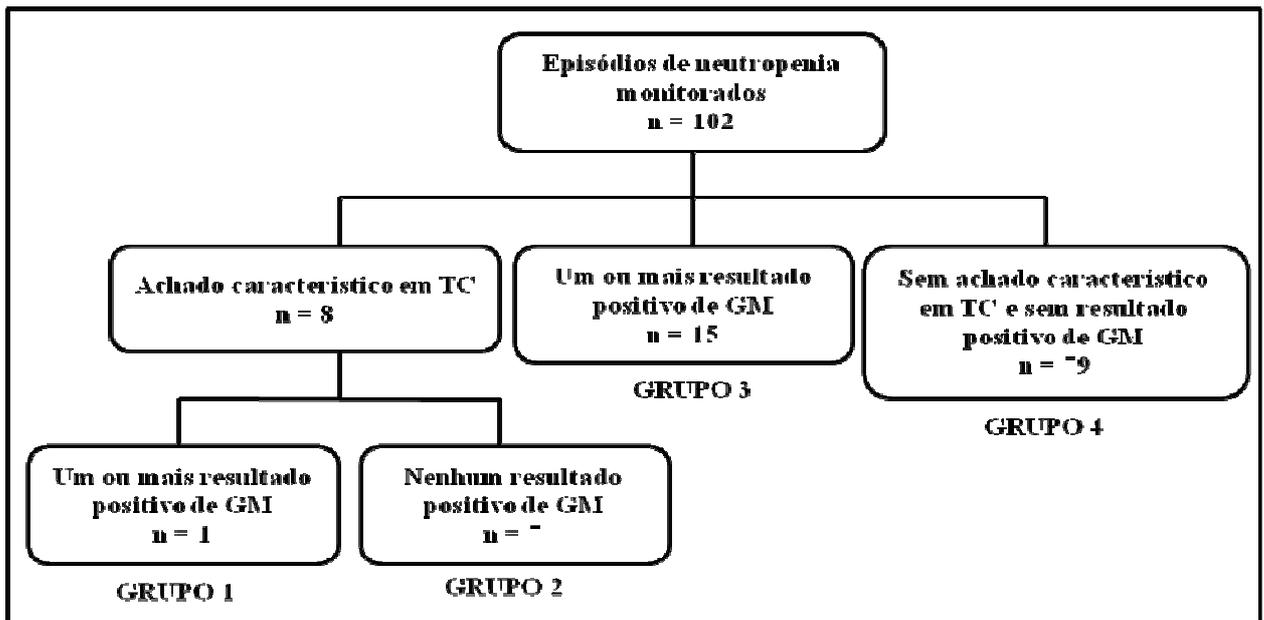
Além do uso de antibióticos existem outras situações associadas a resultados falsos positivos no teste ELISA-GM, entre essas são citadas a realização de hemodiálise e a presença de autoanticorpos na amostra. Nenhum paciente dos 102 episódios foi submetido ao processo de hemodiálise durante o estudo e foi relatada autoimunidade em apenas um caso. A autoimunidade foi cirrose biliar primária e o episódio apresentou um resultado de teste de GM positivo.

5.2 Associação entre resultados de imunoensaio enzimático para detecção do antígeno GM e características clínicas dos episódios de neutropenia

Os episódios foram agrupados de acordo com as principais características utilizadas para definição de diagnóstico da aspergilose invasiva segundo consenso revisado pela EORTC/MSG, que são achados característicos de doença fúngica invasiva em tomografia computadorizada (TC) do tórax e resultados positivos em imunoensaio enzimático de

detecção de galactomanana (GM) em amostras de soro, critério micológico objeto deste estudo. A figura 8 mostra esta subdivisão de grupos (de 1 a 4) de acordo com estas características.

Figura 8. Estratificação dos episódios de neutropenia de acordo com apresentação de sinais característicos de doença fúngica invasiva em tomografia computadorizada (TC) de tórax e resultado positivo em imunensaio enzimático de detecção de galactomanana (GM) em amostras de soro.

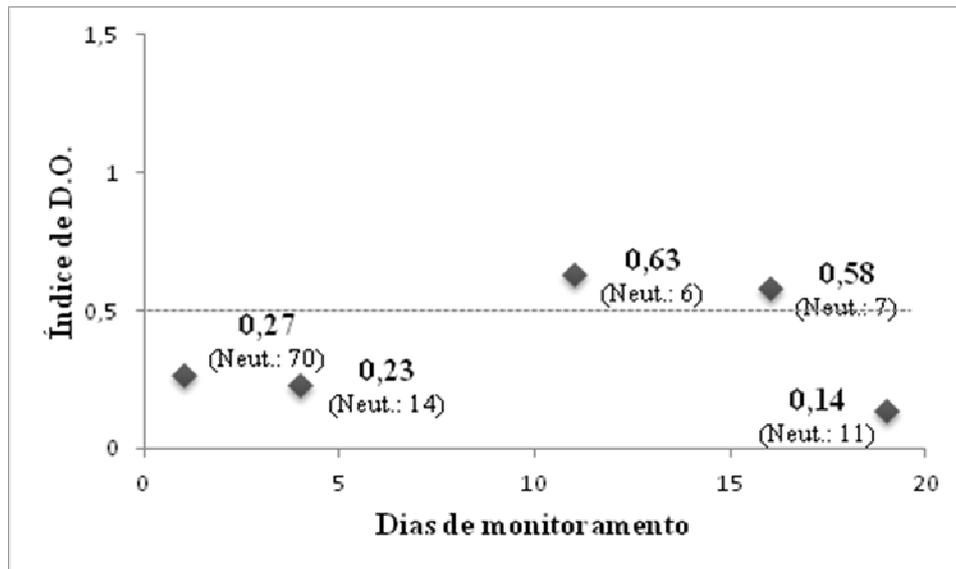


5.3 Características clínicas do episódio com achado característico de DFI em TC de tórax associado a resultados positivos em imunensaio de detecção de galactomanana (grupo 1)

Para um único episódio houve associação de achado característico em TC e ensaio GM positivo. Esta paciente, sexo feminino, 19 anos de idade, apresentava-se em crise blástica de leucemia mielóide crônica, em fase de indução da remissão. Foi iniciado seu monitoramento com um dia de neutropenia e contagem absoluta de neutrófilos de 70 células/ μ L. Seu primeiro resultado de índice de D.O. positivo em ensaio de GM foi no décimo primeiro dia de neutropenia, com ensaio subsequente positivo no décimo sexto dia (ver gráfico da figura 9). Durante o episódio foi realizada TC de tórax que mostrou sinal denso, com lesão bem circundada, sem sinal de halo. Os antifúngicos utilizados foram fluconazol e a anfotericina B, esta após primeiro resultado positivo. O índice 0,14 ocorreu no dia 19.

O sintoma apresentado no episódio do grupo 1 que poderia estar relacionado com a DFI pulmonar foi tosse. Além disso demonstrou edema periorbital e sintomas do trato respiratório superior. Houve no período resultado de hemocultura positivo com identificação de *Enterobacter aerogenes*.

Figura 9. Índices de D.O. em ensaio de detecção de GM durante monitoramento do episódio referente ao grupo 1 (Neut.: contagem absoluta de neutrófilos em células / μL).



5.4 Características clínicas dos episódios com achados característicos de DFI em TC de tórax e sem resultados positivos em imunoenaios de detecção de galatomanana (grupo 2)

Em todos os casos deste grupo houve algum achado característico de doença fúngica invasiva em TC do tórax, porém, sem resultados positivos em ensaio de detecção de GM. Os achados foram: 5 episódios com sinal denso, com lesão bem circundada, com halo (em um deles foi visto também o achado de cavidade); e 2 episódios com sinal denso, com lesão bem circundada, sem halo. O quadro 1 reúne algumas características gerais dos episódios deste grupo.

Quadro 1. Características gerais dos episódios do grupo 2.**Grupo 2**

- Doenças hematológicas de base

LLA: 3 episódios (dois em indução; um em consolidação) - 42,8%

LMA: 1 episódio (em indução) - 14,3%

MM: 1 episódio (em consolidação) - 14,3%

Linfoma linfoblástico de células T (em consolidação): 1 episódio - 14,3%

Aplasia: 1 episódio - 14,3%

- Dias de neutropenia ao início do monitoramento

Média: 4

Mediana (faixa): 4 (1 - 8)

- Dias de neutropenia ao final do monitoramento

Média: 14

Mediana (faixa): 13 (7 - 25)

- Neutropenia prolongada (< 500 neutrófilos / μ L por > 10 dias): em 4 episódios - 57,1%

- Nº de amostras testadas / episódio

Média: 3

Mediana (faixa): 3 (2 - 6)

- Antifúngicos

Voriconazol em 2 episódios - 28,6%

Voriconazol / Anfotericina B em 1 episódio - 14,3%

Voriconazol / Anfotericina B / Fluconazol em 1 episódio - 14,3%

Caspofungina em 1 episódio - 14,3%

Fluconazol em 2 episódios - 28,6%

- Sintomas

2 episódios com um sintoma de infecção do trato respiratório baixo - 28,6%

2 episódios com três sintomas de infecção do trato respiratório baixo - 28,6%

2 episódios com um sintoma de infecção sinonasal - 28,6%

1 episódio sem sintomas - 14,3%

5.5 Características clínicas dos episódios com resultados positivos em imunoensaios de detecção de galatomanana não associados a achados característicos de DFI em TC de tórax (grupo 3)

Todos episódios deste grupo tem em comum ao menos um índice de D.O. em ensaio de detecção de GM positivo, porém, sem achado característico de doença fúngica invasiva em TC de tórax. Foi realizada TC em quatro destes episódios. As características gerais dos episódios deste grupo estão reunidas no quadro 2.

Quadro 2. Características gerais dos episódios do grupo 3.**Grupo 3**

- Doenças hematológicas de base

LMA: 4 episódios (todos em indução) - 26,7%

LLA: 3 episódios (todos em indução) - 20%

MM: 3 episódios (todos em consolidação) - 20%

LH: 3 episódios (um em indução e dois em consolidação) - 20%

Linfoma: 1 episódio (em consolidação) - 6,7%

Aplasia: 1 episódio - 6,7%

- Dias de neutropenia ao início do monitoramento

Média: 5

Mediana (faixa): 5 (1 - 19)

- Dias de neutropenia ao final do monitoramento

Média: 12

Mediana (faixa): 12 (4 - 26)

- Neutropenia prolongada (< 500 neutrófilos / μ L por > 10 dias): em 8 episódios - 53,3%

- Nº de amostras testadas / episódio

Média: 3

Mediana (faixa): 3 (2 - 5)

- Antifúngicos

Voriconazol em 5 episódios - 33,3%

Voriconazol / Fluconazol em 1 episódio - 6,7%

Fluconazol em 7 episódios - 46,7%

- Sintomas

3 episódios com um sintoma de infecção do trato respiratório baixo - 20%

1 episódio com um sintoma de infecção sinonasal - 6,7%

1 episódio com dois sintomas de infecção sinonasal - 6,7%

11 episódios sem sintomas - 73%

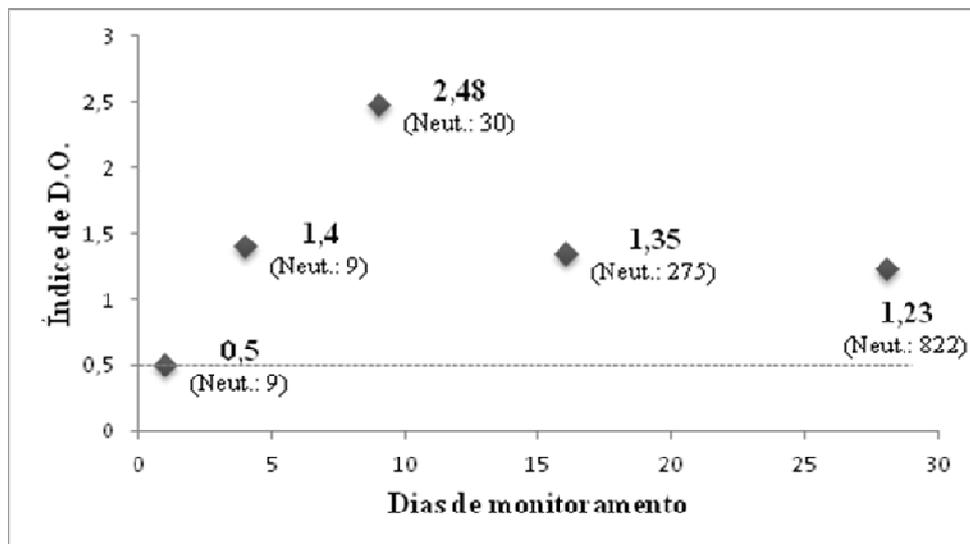
Em dois episódios foi observado ao menos dois resultados positivos consecutivos, sendo que em um deles os valores de índice de D.O. subsequentes simulavam um comportamento característico de curva, com elevação e sem seguida redução nos valores dos índices, como pode ser observado na figura 10. Em sete episódios daqueles que tiveram

apenas uma dosagem positiva houve resultados subsequentes negativos, e nos seis restantes o monitoramento foi interrompido após o resultado positivo.

Nos episódios em que houve dois ou mais ensaios de GM positivos foi feito o uso do voriconazol. Em um deles, com LLA como doença de base em fase de indução, o voriconazol foi utilizado desde o início do monitoramento, no qual foram feitas duas coletas para teste e os dois resultados foram positivos; um único sintoma que estaria relacionado à infecção do trato respiratório baixo foi tosse. O acompanhamento foi finalizado em 7 dias de neutropenia.

No segundo caso (figura 10), o uso do voriconazol foi iniciado a partir da segunda coleta de amostra biológica para teste; durante o acompanhamento não foi observado o desenvolvimento de sintomas e notou-se um declínio nos valores de índices de D.O. ao longo da antifungoterapia e da recuperação dos neutrófilos. Durante o episódio foi notificado resultado positivo de hemocultura com identificação de *Klebsiella* spp..

Figura 10. Índices de D.O. em ensaio de detecção de GM durante monitoramento do episódio pertencente ao grupo 3 onde foram vistos mais que dois índices positivos (Neut.: contagem absoluta de neutrófilos em células / μ L).



5.6 Características clínicas dos episódios sem achados característicos de DFI em TC de tórax e sem resultados positivos em imunoenaios de detecção de galatomanana (grupo 4)

Em 79 casos de neutropenia acompanhados não foram observados achados característicos em TC ou resultados positivos em ensaios de detecção de GM. Foi realizada

TC de tórax em sete destes casos. As características gerais dos episódios deste grupo estão reunidas no quadro 3.

Quadro 3. Características gerais dos episódios do grupo 4.

Grupo 4
<ul style="list-style-type: none"> • Doenças hematológicas de base <ul style="list-style-type: none"> LMA: 21 episódios (12 em indução, 9 em consolidação) - 26,6% LLA: 18 episódios (12 em indução, 6 em consolidação) - 22,8% MM: 13 episódios (8 em indução, 5 em consolidação) - 16,5% LNH: 7 episódios (4 em indução, 3 em consolidação) - 8,9% LH: 3 episódios (2 em indução, 1 em consolidação) - 3,8% Outras: 17 episódios • Dias de neutropenia ao início do monitoramento <ul style="list-style-type: none"> Média: 4 Mediana (faixa): 3 (1 - 32) • Dias de neutropenia ao final do monitoramento <ul style="list-style-type: none"> Média: 12 Mediana (faixa): 9 (3 - 51) • Neutropenia prolongada (< 500 neutrófilos / μL por > 10 dias): em 35 episódios - 44,3% • Nº de amostras testadas / episódio <ul style="list-style-type: none"> Média: 3 Mediana (faixa): 2 (2 - 7) • Antifúngicos <ul style="list-style-type: none"> Voriconazol em 10 episódios - 12,7% Anfotericina B em 3 episódios - 3,8% Caspofungina em 1 episódio - 1,3% Voriconazol / Anfotericina B em 1 episódio - 1,3% Voriconazol / Fluconazol em 6 episódios - 7,6% Anfotericina B / Fluconazol em 4 episódios - 5,1% Voriconazol / Anfotericina B / Fluconazol em 1 episódio - 1,3% Fluconazol em 38 episódios - 48,1% • Sintomas <ul style="list-style-type: none"> Dez episódios com um sintoma de infecção do trato respiratório baixo - 12,7% Um episódio com dois sintomas de infecção do trato respiratório baixo - 1,3% Três episódios com um sintoma de infecção sinonasal - 3,8% 67 episódios sem sintomas - 84,8%

Entre os casos com neutropenia prolongada deste grupo foram notificados quatro casos de bacteremia, três por bactérias Gram negativas e um com Gram negativa e Gram positiva. Houve também uma notificação de infecção por *Candida* não albicans e outra por *Fusarium* spp..

5.7 Características gerais dos episódios de neutropenia prolongada

Ao final do estudo notou-se que em média os episódios tinham 4 dias de neutropenia ao início do monitoramento (1-32) e 12 dias ao final (3-51), e que em 48 episódios foram feitos imunoensaios para detecção de galactomanana após 10 dias de neutropenia, ou seja, em 47% (48/102). Dados gerais correspondentes aos 48 episódios de neutropenia prolongada estão resumidos na tabela abaixo.

Tabela 8. Características gerais dos episódios de neutropenia prolongada (Neutrófilos < 500 células / μ L por mais que 10 dias).

Características	Nº
Nº total	48
Dias de neutropenia ao final do monitoramento*	
Média	18
Mediana (faixa)	16 (11 - 51)
Doenças hematológicas mais frequentes	
LMA	19
LLA	12
Fase atual da quimioterapia*	
Indução	33
Consolidação	12
Uso de antifúngicos	
Fluconazol	24
Anfotericina B	8
Voriconazol	19
Caspofungina	2
≥ 2 índices positivos consecutivos em ELISA-GM	2
Associação de índice positivo em ELISA-GM e sinal característico em TC de tórax	1

LMA, leucemia mieloide aguda; LLA, leucemia linfóide aguda.

* Foram excluídos destes itens os casos de aplasia medular.

5.8 Reprodutibilidade dos resultados positivos em imunoensaio enzimático para a detecção de galactomanana em amostras de soro

Durante este período foram testadas 307 amostras referentes aos episódios acompanhados. Deste total, o ensaio foi repetido com 49 amostras devido ao resultado positivo. Foi então feita uma análise da reprodutibilidade destes resultados no segundo ensaio (GM2) com relação ao primeiro (GM1). Apenas resultados repetidamente positivos foram assim considerados para análises dos episódios.

Algumas especificações relacionadas às amostras e testes são demonstradas na tabela 8. A figura 11 é a representação gráfica dos resultados em índice de D.O. em primeiro e segundo ensaio nos eixos horizontal e vertical, respectivamente.

Em 36 das 49 amostras retestadas (73%) houve redução nos valores dos índices (Tabela 9). Para as amostras que tiveram índices menores em segundo teste a média da redução dos índices de D.O. foi -0,84 (mediana=-0,55; mín.=-0,12; máx.=-4,99).

Apenas 16% (8/49) das amostras retestadas permaneceram com mesmo resultado, e para cinco amostras (10%) os índices de D.O. foram maiores no segundo ensaio (Tabela 9)

Em 55% (27/49) das vezes o resultado se tornou negativo em GM2 (Tabela 9).

Todas as amostras ficaram armazenadas a -20°C até realização do segundo teste, e em média o tempo, em dias, entre GM1 e GM2 foi de 7 dias (Tabela 9).

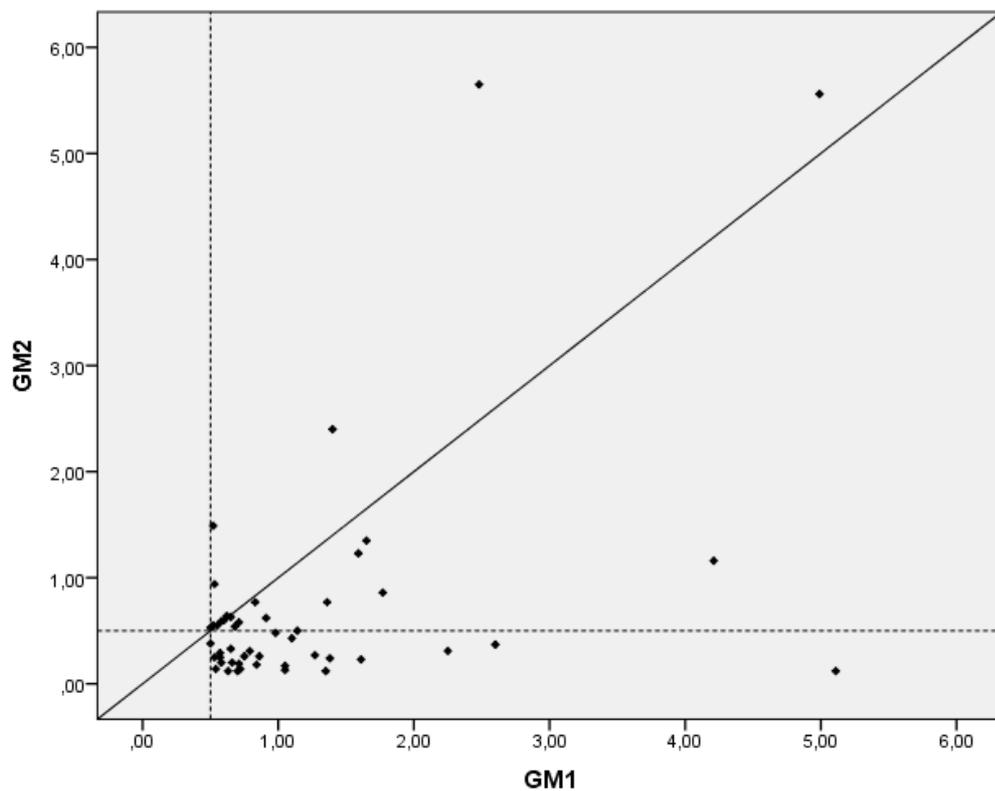
As médias de tempo entre execução de GM1 e GM2 das amostras que permaneceram positivas e daquelas que se tornaram negativas foram de 8 e 5 dias respectivamente, e a comparação entre as médias foi estatisticamente não significante ($p=0,3412$, teste de Mann Whitney). Também não houve correlação estatisticamente significante entre a diferença dos índices GM2 e GM1 e o tempo de armazenamento das amostras ($p=0,769$, correlação de Spearman).

Tabela 9. Características das amostras retestadas.

Nº de amostras retestadas	49	
Média de índice de D.O. em GM1	1,21	
Média de índice de D.O. em GM2	0,71	
Comparação entre os índices de D.O. em GM1 e GM2		
	Menor	73% (36/49)
	Igual*	16% (8/49)
	Maior	10% (5/49)
Resultado em GM2		
	Positivo	45% (22/49)
	Negativo	55% (27/49)
Tempo médio entre GM1 e GM2 (dias)	7, mediana = 6	

* Foram considerados iguais os índices que em GM2 apresentaram uma diferença de até 10% para mais ou para menos com relação aos índices em GM1.

Figura 11. Representação gráfica da reprodutibilidade de resultados positivos do ensaio imunoenzimático de detecção de GM mostrando os índices de D.O. no primeiro (GM1) e segundo (GM2) teste.



6. DISCUSSÃO

As doenças hematológicas são evidenciadas como as principais condições de base para predisposição ao desenvolvimento da aspergilose invasiva (AI). Neste estudo temos 100% dos episódios de neutropenia em indivíduos com doença hematológica diagnosticada, uma vez que este foi um dos critérios de inclusão, e de acordo com a distribuição dos tipos das doenças as mais frequentes foram: leucemia mielóide aguda (25,5%, n=26), leucemia linfóide aguda (23,5%, n=24), mieloma múltiplo (16,7%, n=17) (Tabela 3 e Figura 6). Estas são justamente as entidades de maiores prevalências entre os casos de AI diagnosticada relatados em literatura (HERBRECHT, 2011). Associados às doenças hematológicas os transplantes de medula óssea (TMO) também configuram condições predisponentes, em especial aqueles do tipo alogênico. Nesta população observou-se uma prevalência de 18,6% (n=19) de TMO autólogo e de 7,8% (n=8) de TMO alogênico (Tabela 3), havendo neste caso uma menor proporção da condição considerada de maior risco (HERBRECHT, 2011).

O principal fator do hospedeiro da população estudada foi a neutropenia, sendo este outro critério de inclusão. A neutropenia prolongada acima de 10 dias é destacada entre os fatores do hospedeiro em consenso para diagnóstico da doença fúngica invasiva elaborado pela EORTC/MSG, e a maioria dos trabalhos sobre o tema utiliza este como critério de inclusão (DE PAUW, 2008; MAERTENS, 2005; PARK, 2011). Mas como esta pesquisa tinha como objetivo a implantação de uma técnica aprovada recentemente (em 2007 pela ANVISA) e foi necessário o conhecimento da relação entre este fator e o diagnóstico da AI invasiva na população alvo, foram admitidos episódios com variação de 1 a 32 dias de neutropenia para início do monitoramento, com uma média de 4 dias (mediana de 3 dias). Ao final do monitoramento os episódios apresentaram em média 12 dias de neutropenia (mediana de 10 dias), ocorrendo uma variação de 3 a 51 dias (Tabela 3).

A duração da neutropenia é um importante aspecto a ser analisado. Em estudo publicado por Park e cols. em 2010 onde foram analisados retrospectivamente 58 episódios de pacientes com leucemia aguda e diagnóstico de AI provada ou provável a média de duração da neutropenia encontrada foi de 31 dias (11 – 142). Em 2011 Saghrouni e cols. relataram 29 casos de aspergilose invasiva, com predomínio de leucemia mielóide aguda como doença de base, e entre estes casos a média de duração da neutropenia foi de 27 dias.

Logo, ao se conjecturar a predisposição da população alvo deste estudo para o desenvolvimento da AI deve-se considerar que se por um lado predominam as doenças de base de maior prevalência em grandes estudos envolvendo situações de AI já diagnosticada,

por outro se tratam de episódios com média de duração de neutropenia relativamente baixa. Em 48 episódios dos 102 estudados (47%) foi feito acompanhamento dos pacientes com mais de 10 dias de neutropenia com coletas de amostras para detecção de GM (Tabela 8).

Outros condições e fatores associados à predisposição para AI tiveram baixa expressão entre os episódios estudados: 8,8% de uso prolongado de corticosteroide (n=9), 3,9% de doença enxerto *versus* hospedeiro (n=4), 5,9% de síndrome da imunodeficiência adquirida (n=6), 9,8% de uso de análogos de nucleosídeo (n=10). Não foram reconhecidas outras causas de imunodeficiência entre os envolvidos.

Houve febre na maior parte dos episódios (61,8%, n=63), embora não necessariamente fosse relacionada à DFI. Este é um sintoma comum dado esse cenário, uma vez que todos os participantes encontravam-se imunocomprometidos e susceptíveis a diversas infecções. Em consenso revisado pela EORTC/MSG a febre deixou de constituir um fator de risco (ASCIOGLU, 2002; DE PAUW, 2008).

Devido a altas taxas de mortalidade por DFI o uso de antifúngicos tem sido recomendado em grupos selecionados de alto risco, tanto o uso profilático quanto o empírico. O fluconazol foi o antifúngico utilizado com maior frequência (58,8%, n=60) (Figura 7), entretanto, devido a sua falta de atividade contra fungos filamentosos seu uso não foi considerado uma possível causa para resultados falsos negativos nos testes de detecção de galactomanana em soro (MIKOLAJEWSKA, 2012).

Já o voriconazol foi o segundo antifúngico mais utilizado (27,4%, 28/102) durante o estudo. Como pode ser visto nos resultados, foi prescrito principalmente em casos de leucemias agudas (um total de 21 casos), na maior parte das vezes em fases de indução na quimioterapia. Como a doença invasiva causada por fungos filamentosos é de difícil diagnóstico e elevadas taxas de mortalidade, o uso empírico de antifúngicos em situações de febre persistente em neutropênicos tem se tornado padrão (TAN, 2011). Neste trabalho, em quase todos os episódios em que o voriconazol foi indicado ocorreu febre, além de na maioria das vezes se tratar de pacientes com maiores chances de contrair infecção por *Aspergillus* sp. dadas a doença de base, fase da quimioterapia, duração da neutropenia.

Em uma grande coorte envolvendo pacientes de alto risco para desenvolvimento de AI em dois centros norte americano para tratamento de doenças hematológicas objetivou-se determinar o desempenho do imunoensaio de detecção de GM frente à terapia antifúngica e foi demonstrado que a sensibilidade do teste é comprometida pela administração de drogas com atividade contra fungos filamentosos, o que reforça a explicação da redução dos níveis do antígeno pela diminuição da carga fúngica (MARR, 2005). Assim, uma vez que o serviço

de hematologia adotava um protocolo de antifungoterapia predominantemente empírico durante o estudo foi esperada uma baixa prevalência de casos com dados para classificação em diagnóstico “provável” de AI, para o qual se considera os índices positivos de detecção de GM.

Ao analisar os resultados no ensaio de detecção de GM com relação ao uso do voriconazol nos episódios febris nota-se aqui que não ocorreram mais resultados positivos entre aqueles que não fizeram o uso da droga, pois quando se utilizou o antifúngico foi observado resultado positivo em 20,0% (4/20) e entre aqueles que não o fizeram esta proporção foi de 13,9% (6/43) (Tabela 5). Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,7126$) e se for excluído o caso em que a terapia foi iniciada após resultado positivo de GM (Figura 10) as proporções tornam-se ainda mais próximas, 15,8% (3/19) e 13,9% (6/43). Assim, não se pode afirmar que estes dados contradizem a ideia do que se tem constatado em experiências com uso do imunoensaio, que é a redução da sensibilidade da técnica pelo uso de antifúngicos.

Desde que o imunoensaio passou a ser utilizado em populações que preenchem critérios de fatores do hospedeiro de predisposição à AI o uso de antibióticos de origem fúngica foi um dos fatores associados a resultados falsos positivos. Foi avaliada uma possível influência do uso de piperacilina-tazobactam nos resultados positivos deste trabalho tanto entre os episódios febris (Tabela 6) quanto na população em geral (Tabela 7). Ocorreram maiores proporções de episódios com resultados positivos entre aqueles que usaram a formulação: 14,6% (6/41) *versus* 18,2% (4/22) ($p=0,7291$); e 15,6% (12/77) *versus* 16,0% (4/25) ($p=1,00$), respectivamente. Entretanto, estas diferenças foram baixas e não estatisticamente significantes.

Um estudo realizado no Brasil analisou a possibilidade de detecção de GM em lotes da formulação piperacilina-tazobactam comercializados no país, e cinco lotes de marcas distintas foram testados em duplicata e em laboratórios diferentes. Apenas um lote demonstrou reação cruzada com valores de índices de D.O. acima de 0,5 (XAVIER, 2009). Estes resultados sugeriram que o uso do antibiótico pode não ser uma causa significativa de resultados falsos positivos, e talvez por isso não se tenha observado uma influência do seu uso nos resultados dos testes dos episódios aqui estudados.

A presença de autoanticorpos em amostras de soro é mencionada como um dos fatores associados a resultados falsos positivos no imunoensaio enzimático para detecção de GM (AQUINO, 2007). Neste trabalho não houve relatos de autoimunidade entre os participantes além de um episódio em que o indivíduo possuía cirrose biliar primária. Foram feitos dois

testes de ELISA-GM com resultado positivo no segundo, após o qual o monitoramento foi interrompido. O resultado positivo não necessariamente foi devido a esta condição do paciente, e os dados deste caso assim como da população em geral são insuficientes para apontar alguma associação deste fator, autoimunidade, e os resultados do teste utilizado.

O consenso para diagnóstico de DFI considera como AI “provável” a situação onde o paciente possui um fator do hospedeiro, um critério clínico (achado característico da DFI em TC do tórax), e um critério micológico, que neste estudo é o teste indireto positivo para detecção do antígeno galactomanana em amostra de soro (DE PAUW, 2008). Como base nestes critérios os episódios foram distribuídos em quatro grupos (Figura 8). Foram encontrados sinais característicos em TC em oito episódios e testes de detecção do antígeno GM positivos em 16 episódios.

No grupo 1 tem-se a associação dos dois critérios necessários para diagnóstico da AI “provável” e é representado por único episódio. O monitoramento neste caso foi iniciado com um dia de neutropenia, e o primeiro resultado positivo em índice de D.O. ocorreu no décimo primeiro dia (Figura 4). Foi observado um sintoma inespecífico de infecção pulmonar, a tosse, que dado o contexto poderia estar relacionado a um provável caso de AI. A formulação piperacilina-tazobactam foi utilizada, porém, como foi discutido anteriormente, não se pode presumir que tenham ocorrido falso positivo devido a este motivo.

Uma outra característica deste episódio indicada como um fator associado a falso positivo na reação de detecção de GM seria a bacteremia, neste caso demonstrada pela identificação de *Enterobacter aerogenes* em hemocultura. Porém, não se conhecem mecanismos que justifiquem a relação e nenhum microrganismo específico foi consistentemente associado com reação falso positiva (AQUINO, 2007).

À paciente do presente caso foi administrada a anfotericina B, um composto que possui atividade *in vitro*, *in vivo* e clínica contra espécies de *Aspergillus* e é licenciada para tratamento da aspergilose invasiva (WALSH, 2008). Concomitante ao tratamento notou-se a queda e a negatização dos índices de D.O. no imunoensaio, como pode ser visto na figura 9. Talvez este comportamento dos índices tenha resultado da atividade da droga reduzindo a carga fúngica da “provável” aspergilose invasiva.

Já no grupo 2 estão reunidos todos os episódios onde foram encontrados sinais característicos de DFI e nenhum resultado positivo em testes de detecção de galactomanana (n=7) (Figura 8). As doenças de base mais frequentes neste grupo foram também as mais frequentes na população geral. Destes casos, quatro mantiveram neutropenia prolongada durante acompanhamento, com neutrófilos abaixo de 500 células / μL por mais de 10 dias,

sendo que um destes tinha aplasia e portanto uma neutropenia com duração acima da média do estudo (Quadro 1). Estes quatro casos preenchem os critérios de fator do hospedeiro (neutropenia prolongada) e evidência clínica consistente com DFI, mas para os quais não existem apoio do critério micológico. Estas características se enquadram na definição para diagnóstico de AI “possível”, e em todas as situações foi prescrito antifúngico ativo. Houve sintomas compatíveis com infecção pulmonar em 57,1% (4/7) do grupo, sendo um destes episódio de neutropenia prolongada.

Em 71,4% (5/7) dos casos foram utilizadas drogas com atividades contra fungos filamentosos, o que pode ser observado ao somar os números de episódios onde se utilizou voriconazol, anfotericina B ou caspofungina (Quadro 1).

No Quadro 2 estão as características de todos os casos agrupados por demonstrarem ao menos um resultado positivo em ensaios de detecção de GM, porém, não associados a achados característicos de DFI em TC de tórax. Neste grupo, assim como no grupo 2, as doenças de base mais frequentes foram também as mais prevalentes do estudo. Foi observada neutropenia prolongada em oito casos, ou seja, 53,3% (8/15), proporção semelhante a que foi encontrado entre os casos que apresentaram apenas o critério clínico para diagnóstico da DFI, grupo 3 (p=1,000).

Dois episódios deste grupo mostraram ao menos dois resultados positivos consecutivos em detecção de GM. Segundo as definições do consenso de 2002 para diagnóstico da DFI um destes estes episódios demonstrou dados suficientes para definição de AI “possível” (ASCIUGLU, 2002), pois apresentava também neutropenia prolongada. Porém, por consenso atual os dois episódios são considerados como não classificáveis quanto ao diagnóstico, assim como os demais do grupo 3 (DE PAUW, 2008).

Por deixar de preencher critérios de inclusão em um dado momento, assim como ocorreu em todos os casos do estudo, a situação em que foram vistos dois índices positivos consecutivos não pôde ser mais acompanhada. Já no episódio representado na figura 10 foi possível realizar o teste em amostras de cinco coletas seriadas, e inclusive na última o paciente já não mais se encontrava com neutrófilos abaixo de 500 células / μ L. Após primeira coleta foi instituído o tratamento antifúngico e durante o mesmo houve recuperação dos neutrófilos concomitante à redução dos índices de D.O. do teste. A única manifestação de infecção foi febre. O comportamento destes índices mostra que talvez este tenha sido um caso suspeito do que poderia evoluir para AI com nível de diagnóstico “provável” (DE PAUW, 2008). O paciente foi tratado, e vale lembrar que as definições dos consensos foram planejadas para o uso no contexto da pesquisa clínica e/ou epidemiológica, mas não

necessariamente para a tomada de decisões pela equipe médica (ASCIOGLU, 2002; TSITSIKAS, 2011).

Um dado notável foi que o episódio acima citado foi o único entre aqueles com mieloma múltiplo como doença de base em que a neutropenia durou mais que 10 dias durante participação no estudo, ou seja, o único destes a cumprir o fator do hospedeiro como critério diagnóstico por consenso (DE PAUW, 2008).

A detecção de antígenos fúngicos parece preceder os sinais clínicos e radiológicos da DFI (MIKOLAJEWSKA, 2012). Contudo, neste trabalho não se pode fazer uma análise estatística do que poderia ser a influência do uso do voriconazol no impedimento da progressão para manifestação do critério clínico (sinais característicos em TC) de uma provável AI identificada inicialmente pela observação de resultado positivo em teste de GM, pois nota-se no grupo 3 apenas quatro casos de neutropenia prolongada onde foram realizados exames de TC e em somente um destes foi utilizado o voriconazol.

Esta circunstância em que foram seriados cinco resultados positivos com redução dos índices concomitante ao tratamento e recuperação dos neutrófilos suscita a questão da redução da sensibilidade das definições propostas em consenso revisado em 2008.

Considerando essa questão de redução da sensibilidade das definições após revisão, em 2010, Nucci e cols. revisaram 125 casos de aspergilose invasiva provados ou prováveis (114 em pacientes com mieloma múltiplo), todos com índices positivos em teste de GM. Observou-se que em 26 de 53 casos originalmente classificados como AI prováveis sem achados radiológicos prévios foram feitos testes de imagem seriados após primeira TC, e então 11/26 (42%) mostraram desenvolvimento de algum dos três sinais característicos de DFI citados em consenso somente após os resultados positivos de teste de GM. Essa revisão mostrou a importância de situações onde o fator do hospedeiro é acompanhado de índices positivos consecutivos em detecção de GM sem apresentação de sinais específicos, podendo representar uma categoria da infecção em estágio inicial.

Com relação às situações onde foi visto um resultado positivo e um subsequente negativo (sete casos) se questionou a possibilidade da ação do antifúngico reduzindo o índice posterior, mas notou-se que apenas em um caso foi utilizado voriconazol antes da negativação do índice e o mesmo tinha apenas cinco dias de neutropenia, ou seja, menos dias do que se propõe como fator do hospedeiro. Desta forma, é mais plausível que neste e nos outros seis casos na mesma situação tenham ocorrido resultados falsos positivos ainda que não pelo uso dos antibióticos, usado em três destes episódios. Entre os fatores associados a falsos positivos

pode-se excluir aqui: condição de ser paciente pediátrico, bacteremia, hemodiálise, presença de autoanticorpos (AQUINO, 2007).

Analisa-se agora os episódios em que a última dosagem foi positiva e logo em seguida o monitoramento foi interrompido (seis episódios): quatro atendiam ao critério de fator do hospedeiro no momento da dosagem e para estes seria de suma importância a continuação do monitoramento (mesmo após a recuperação do nível de neutrófilos) e a associação do teste de GM com resultados de outras avaliações, como TC de tórax (feita em dois episódios, em um dos quais com revelação de consolidação alveolar), dosagem de β -D-glucana em soro, análise de escarro ou lavado broncoalveolar, resultados de culturas de amostras de sítios relacionados à infecção (DE PAUW, 2008).

No grupo 4, onde em todos os casos nenhum dos critérios de TC e GM para diagnóstico de AI é preenchido, também se observa maiores frequências das doenças de base mais prevalentes do estudo em geral (quadro 3). A proporção de neutropenia prolongada neste grupo foi de 44,3% (35/79), valor próximo aos encontrados nos grupos 2 e 3 ($p=0,796$ e $p=0,7182$, respectivamente).

Entre os episódios deste grupo foram utilizados os antifúngicos voriconazol, anfotericina B ou caspofungina em 26 episódios, ou seja, em 32,9% (26/79). Quando comparamos esta variável deste grupo com os grupos 2 e 3 também não encontramos diferença estatisticamente significativa ($p=0,1045$ e $p=0,8150$, respectivamente).

Interessante notar que tanto no caso em que houve a associação de achado característico em TC com testes de detecção de GM positivos (grupo 1) quanto no caso onde ocorreram cinco dosagens de GM positivas consecutivas (Figura 10) existiu bacteremia, levantando mais uma vez a questão já mencionada deste fator associando-se a falsos positivos. Entretanto, existiram quatro casos de neutropenia prolongada e bacteremia, três por bactérias Gram negativas, que não tiveram índices positivos no imunoensaio, episódios estes pertencentes ao grupo 4.

Já com relação ao desempenho da técnica, neste trabalho a análise da reprodutibilidade dos resultados positivos do teste de ELISA para detecção de galactomanana revelou uma tendência à redução dos índices de D.O. nas repetições, tendência também observada em outras experiências com uso do mesmo kit publicadas recentemente. No laboratório de um hospital de nível de atenção terciária em Israel foram retestadas 34 amostras positivas e 85% destas mostraram índices de D.O. menores em segundo teste com média de redução nos valores dos índices de - 0,39 (OREN, 2011). A experiência em outro laboratório, este também pertencente a um hospital de atenção terciária, desta vez na Suíça, mostrou que houve redução

nos índices de D.O. de 79% (23/29) das amostras positivas retestadas com uma média de redução nos índices de - 0,33 (BIZZINI, 2011). Esses resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo, onde os índices de D.O. foram menores em 73% (36/49) das amostras em segundo ensaio e a média de redução nos valores foi de - 0,84.

O armazenamento da amostra de soro pode influenciar no desempenho do imunoensaio enzimático para detecção de GM (MENNINK-KERSTEN, 2004; AQUINO, 2007). A partir desta premissa foram feitas análises para observar a potencial influência do tempo de armazenamento das amostras à -20°C sobre a tendência de redução dos valores dos índices em segundo ensaio, e então não foi vista diferença entre as amostras que permaneceram positivas e aquelas que se tornaram negativas quanto ao período de tempo (dias) entre execução dos testes GM1 e GM2 ($p=0,3412$, teste de Mann Whitney), assim como não houve correlação entre este período de tempo e as diferenças de índices entre os testes ($p=0,769$, correlação de Spearman).

Talvez a influência dessa variável sobre desempenho do teste possa ser notada em estudos que envolvam N maior e / ou períodos maiores de armazenamento da amostra a - 20°C. Mas apesar de não sido constatada aqui a ação desta variável, a repetição dos testes positivos deve ser realizada o mais breve possível para que o corpo clínico alcance um diagnóstico rápido e proporcione o tratamento mais adequado a cada paciente.

A repetição de todos os testes positivos é de grande importância devido à possibilidade de contaminação da amostra durante sua manipulação; entretanto, a contaminação não deve ser uma explicação para o grande número de amostras que já não foram positivas em segundo teste, pois todas as amostras foram obtidas em tubos de coleta a vácuo e todos os procedimentos foram conduzidos em câmara de fluxo laminar de maneira padronizada.

A baixa reprodutibilidade dos resultados positivos mostrada com uso da técnica de ELISA-GM reforça a necessidade do reteste para todos os resultados positivos (e o mais rápido possível) para que sejam evitados diagnósticos e tratamentos baseados em falsos positivos. Mais dados a respeito do desempenho do imunoensaio são necessários para aprimorar a utilização da detecção de GM na prática clínica.

Em resumo, quanto à investigação da incidência da AI no período de estudo um episódio cumpriu os critérios para diagnóstico “provável”, o qual representou 2% dos episódios de neutropenia prolongada ($n=48$). Quatro episódios uniu fator do hospedeiro e sinal característico em TC, e portanto seriam classificados como casos “possíveis” de AI, 8% dos episódios de neutropenia prolongada (Tabela 8). Do total de episódios incluídos ($n=102$) estes casos representam 1% e 4%, respectivamente.

7. CONCLUSÕES

Casos de neutropenias prolongadas acima de 10 dias ocorreram em menos da metade dos casos da população, 47% (48/102), e a terapia empírica para fungos filamentos foi adotada principalmente em episódios com doenças de base mais associadas à aspergilose invasiva (AI) e em boa parte dos casos de neutropenia prolongada. Apesar destes fatores a implantação da técnica de imunoensaio enzimático para detecção de antígeno galactomanana em amostras de soro dos pacientes do Serviço de Hematologia / Oncologia do Complexo HUPES permitiu observar a incidência de um episódio de neutropenia com características para classificação como AI “provável” (2% entre as neutropenias prolongadas e 1% da população em geral).

A implantação da técnica permitiu não somente a observação do caso citado como também revelou um episódio que poderia se tratar de uma infecção por *Aspergillus* spp. em estágio inicial de progressão para AI.

Estes dois casos ocorreram em situações de neutropenia prolongada, o que corresponde ao que é destacado em consenso como fator do hospedeiro para predisposição ao desenvolvimento da AI, e aponta para segurança de se iniciar o monitoramento após os 10 dias neutropenia. Entretanto, iniciar o monitoramento antes disso pode ser útil para avaliar o comportamento dos índices em situações duvidosas.

Em sete episódios (6,8%, 7/102) foram observados resultados de índices de D.O. acima do *cut off* com grandes chances de se tratarem de falsos positivos (FP). Certa frequência de resultados FP parece ser característica inerente à técnica.

Quatro episódios de neutropenia prolongada tiveram monitoramento interrompido após resultado positivo em teste de GM, e para estes seria necessário o acompanhamento dos índices mesmo após recuperação dos neutrófilos para esclarecimento do significado do resultado.

Durante o período de estudo ocorreram 79 episódios de neutropenia (35 de neutropenia prolongada) onde não foram vistos sinais característicos de DFI em TC de tórax ou resultados positivos em teste de GM. Nenhum destes casos evoluiu para manifestações de AI, o que condiz com o elevado valor preditivo negativo reportado para o imunoensaio de detecção do antígeno GM.

O ELISA-GM é de fato uma importante ferramenta para auxílio diagnóstico da AI, assim como para guiar e monitorar a terapia antifúngica. Para otimizar sua utilização, entretanto, é importante a associação dos resultados desta técnica com outras também

consideradas para critério micológico, como exemplo, o teste de detecção de β -D-glucana, o que seria de grande importância para interpretação dos resultados.

Mais estudos nos serviços de hematologia / oncologia do estado da Bahia e região são necessários para o enriquecimento dos dados epidemiológicos da AI utilizando o imunoensaio de detecção do antígeno galactomanana.

Referências

- ALBERTI, C.; BOUAKLINE, A.; RIBAUD, P.; LACROIX, C. e col. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. **Journal of Hospital Infection**. v. 48, p. 198-206, 2001.
- ANVISA. Resolução nº3.288, de 19 de outubro de 2007. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/suplemento/221007_suplemento_1.pdf>. Acesso em: 13 de dezembro de 2012.
- AQUINO, V. R. ; GOLDANI, L. Z. ; PASQUALOTTO, A. C. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Mycopathologia**. v. 163, p. 191-202, 2007.
- ASCIOGLU, S., REX, J., PAUW, H. B., BENNETT, J. E., BILLE, J., CROKAERT, F. e col. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. **Clinical Infectious Diseases**. v. 34, n.1, p. 7-14, 2002.
- BEIRÃO, F; ARAÚJO, R. State of the art diagnostic of mold diseases: a practical guide for clinicians. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2012.
- BEN-AMI, R; LEWIS, R.E.; KONTOYIANNIS D.P. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. **British Journal of Haematology**. v. 150, p. 406-417, 2010.
- BIZZINI, A.; MARCHETTI, O.; MEYLAN, P. Response to: Lack on intra-laboratory reproducibility in using Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay test for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen. **Transplant Infectious Disease**. v. 14, p. 218-219, 2011.
- CARVALHO, A; CUNHA, C; BISTONI, F.; ROMANI, L. Immunotherapy of aspergillosis. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, p. 120-125, 2012.
- CASTÓN-OSORIO, J.J; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. Epidemiology of invasive fungal infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 32, p. S103-S109, 2008.
- CHAI, L.Y.A.; NETEA, M.G.; TEERENSTRA, S.; EARNEST, A. e col. Early proinflammatory cytokines and c-reactive protein trends as predictors of outcome in invasive aspergillosis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 202, n. 9, p. 1454-1462, 2010.
- DAGENAIS, T. R. T; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.
- DE PAUW, B.; WALSH, T.J.; DONNELLY, J. P.; STEVENS, A. D. e col. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer / Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, p. 1813-1821, 2008.
- FONTANA, C.; GAZIANO, M.; FAVARO, M.; CASALINUOVO, I.A. e col. (1-3)- β -D-Glucan vs Galactomannan Antigen in Diagnosing Invasive Fungal Infections (IFIs). **The Open Microbiology Journal**. v. 6, p. 70-73, 2012.
- HAHN, T.; CUMMINGS, K.M.; MICHALEK, A.M.; LIPMAN, B.J. e col. Efficacy of high efficiency particulate air filtration in preventing aspergillosis in immunocompromised patients with hematologic malignancies. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v. 23, n. 9, p. 525-31, 2002.

- HERBRECHT, R.; BORIES, P.; MOULIN, JC; LEDOUX, M.P.; LETSCHER-BRUZ, V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Annals of the new york academy of sciences**. p. 23-30, 2012.
- KALIL, A.C.; LEVITSKY, J; LYDEN E.; STONER J.; FREIFELD, A. G. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. **Ann InternMed**. v. 148, p. 870-80, 2005.
- KEDZIERSKA, A.; KOCHAN, P.; KEDZIERSKA, J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1→3)-β-D-glucan antigens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 26, p. 755-766, 2007.
- KONTOYIANNIS, D.P.; MARR, K.A.; PARK, B.J; ALEXANDER, A.B. e col. Prospective Surveillance for Invasive Fungal Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients, 2001–2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. **Clinical Infectious Diseases**. v. 50, p. 1091-1100, 2010.
- KRADIN, R.L.; MARK, E. J. The Pathology of Pulmonary Disorders Due to *Aspergillus* spp. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v. 132, p. 606-614, 2008.
- LATGE J.P.; KOBAYASHI,H.; DEBEAUPUIS, J.P.; DIAQUIN, M. e col. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**. v. 62, p.5424–33, 1994.
- LEHRNBECHER, T.; KALKUM, M.; CHAMPER, J.; TRAMSEN, L. e col. Immunotherapy in Invasive Fungal Infection - Focus on Invasive Aspergillosis. **Curr Pharm Des**. Dez 26, 2012.
- LILIENFELD A Foundations of epidemiology. Lilienfeld DE; Stolley PD. Foundations of epidemiology. Oxford University Press, EEUU, 3rd, p. 371. **Oxford University Press**, Nova York. 1994.
- MAERTENS, J.; THEUNISSEN, K.; VERHOEF, G.; VERSCHAKELLEN, J. e col. Galactomannan and computed tomography – Based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk of invasive fungal infection: a prospective feasibility study. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 1242-1250, 2005.
- MAERTENS, J.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K.; ELDERE, J. V.; BOOGAERTS, M.. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. **Blood**. v. 97, n. 1, p. 1604-1610, 2001.
- MARR, K. e col. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 190, p. 641-649, 2004.
- MARR, K.A.; LAVERDIERE, M.; GUGEL, A.; LEISENRING, W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. **Clinical Infectious Diseases**. v. 40, p. 1762-1769, 2005.
- MASCHMEYER G.; HAAS, A.; CORNELLY, O.A. Invasive aspergillosis. Epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. **Drugs**. v. 67, p. 1567-601, 2007.

MAYR, A.; LASS-FLÖRL, C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease - review of the literature. **European Journal of Medical Research**. v. 16, p. 153-157, 2011.

MENNINK-KERSTEN, M. A. S. H.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 4, p. 349-357, 2004.

MICELI, M.H.; GRAZZIUTTI, M.L.; WOODS, G.; ZHAO, W. e col. Strong correlation between serum *Aspergillus* galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, p. 1412-1422, 2008.

MIKOLAJEWSKA, A.; SCHWARTZ, S.; RUHNKE, M. Antifungal treatment strategies in patients with haematological diseases or cancer: from prophylaxis to empirical, pre-emptive and targeted therapy. **Mycoses**. v. 55, p. 2-16, 2012.

MIKULSKA, M.; FURFARO, E.; DEL BONO, V; RAIOLA, A.M. e col. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, p. 1746–1748, 2012.

NUCCI, M; GARNICA, M.; GLORIA, A.B.; LEHUGEUR, D.S. e col. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**. 2012.

OLIVEIRA, J.S.R; KERBAUY1, F.R.; COLOMBO, A.L.; BAHIA, D.M.M. e col. Fungal infections in marrow transplant recipients under antifungal prophylaxis with fluconazole. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, n. 7, p. 789-798, 2002.

OREN, I.; AVIDOR, I.; SPRECHER, H. Lack on intra-laboratory reproducibility in using Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay test for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen. **Transplant Infectious Disease**. 2011.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive Mycoses: Diagnostic Challenges. **The American Journal of Medicine**. v. 125, p. S14-S24, 2012.

PAGANO, L.; CAIRA, M.; CANDONI, A.; OFFIDANI, M. e col. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. **Haematologica**. v. 91, p.1068-1075, 2006.

PARK, S. J.; MEHRAD, B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 22, n. 4, p. 535-551, 2009.

PARK, S.H.; CHOI, S.; LEE, D.; CHOI, J. e col. Serum galactomannan strongly correlates with outcome of invasive aspergillosis in acute leukaemia patients. **Mycoses**. v. 54, p.523-530, 2011.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. Diagnosis of Invasive Fungal Infections – Current Limitations of Classical and New Diagnostic Methods. **Business Briefing: European Oncology Review**, p. 1-11, 2005.

PELÁEZ, T.; MUNOZ, P.; GUINEA, J.; VALERIO, M. e col. Outbreak of Invasive Aspergillosis After Major Heart Surgery Caused by Spores in the Air of the Intensive Care Unit. **Clinical Infectious Diseases**. v. 54, n. 3, p. e24-e31, 2012.

- PFEIFFER, C. D.; FINE, J. P.; SAFDAR, N. Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using Galactomannan Assay: A Meta-Analysis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 42, p. 1417–1427, 2006.
- SALAM, Z.H.A.; KARLIN, R. B.; LING, M.L.; YANG, K.S. The impact of portable high-efficiency particulate air filters on the incidence of invasive aspergillosis in a large acute tertiary-care hospital. **Am J Infect Control**. v. 38, n. 4, p. 1-7, 2010.
- SEGAL, B.H. Aspergillosis. **N Engl J Med**. v. 360, p. 1870-84, 2009.
- SHERIF, R.; SEGAL, B.H. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**. v. 16, p. 242-250, 2010.
- SNELDERS, E; MELCHERS, J.G.; VERWEIJ, P. E. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a new challenge in the management of invasive aspergillosis? **Future Microbiol**. v. 6, n. 3, p. 335-347, 2011.
- STEELE, C.; WORMLEY JR, F.L. Immunology of fungal infections: lessons learned from animal models. **Current Opinion in Microbiology**. v.15, p. 413–419, 2012.
- SULAHIAN, A.; BOUTBOUL, F.; RIBAUD, P.; LEBLANC, T. e col. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. **Cancer**. v. 91, n. 2, p. 311-318, 2001.
- TAN, B.H.; LOW, J.G.H; CHLEBICKA, N.L.; KURUP, A. e col. Galactomannan-guided preemptive vs. empirical antifungals in the persistently febrile neutropenic patient: a prospective randomized study. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 15, p. 350-356, 2011.
- TSITSIKAS, D. A; MORIN, A.; ARAF, S; MURTAGH, B. e col. Impact of the revised (2008) EORTC/MSG definitions for invasive fungal disease on the rates of diagnosis of invasive aspergillosis. **Medical Mycology**. p. 1-5, early online, 2011.
- VAN DER LINDEN, J.W.; WARRIS, A.; VAN DER MEER, J.W.; BRESTERS, D. e col. Azole-resistant invasive aspergillosis. **Ned Tijdschr Geneeskd**. 2009.
- WALSH, T.J.; ANAISSIE, E. J.; DENNING, D. W.; HERBRECHT, R e col. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, p. 327-60, 2008.
- XAVIER, M.O.; PASQUALOTTO, A.C.; AQUINO, A.V.; SUKIENNIK, T.C.T.; SEVERO, L.C. Galactomannan Detection from Piperacillin-Tazobactam Brands Available in the Brazilian Market. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 13, n. 5, p. 353-355, 2009.
- ZELANTE, T. e col. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur. J. Immunol**. v. 37, p. 2695–2706, 2007.

APÊNDICE A

	SOLICITAÇÃO DOSAGEM DE ANTÍGENO GALACTOMANANA SERVIÇO DE IMUNOLOGIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS – SIDI FACULDADE DE FARMÁCIA – UFBA	
PACIENTE: _____ Nº PRONTUÁRIO: _____ SEXO: () F () M DATA NASCIMENTO: ___/___/___ DATA DE COLETA: ___/___/___ RG: _____ PROCEDÊNCIA: SERVIÇO DE HEMATOLOGIA/ONCOLOGIA – HOSPITAL SÃO RAFAEL		
Doença hematológica de base: _____ Status da doença: () Remissão () Recidiva Fase atual da quimioterapia (QT): () Indução da remissão () Consolidação da remissão Protocolo de QT atual: _____ / nº de ciclos: _____ Protocolo de QT prévia: _____ / nº de ciclos: _____ Transplante de medula óssea: () Não () Sim → () Autólogo () Allogênico Data do transplante: ___/___/___		
<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: _____ (células/µL) Neutropenia desde: ___/___/___ • Febre? () Não () Sim • Aspergilose invasiva prévia? () Não () Sim → () Possível () Provável () Provada • Outra infecção fúngica invasiva recente ou corrente? () Não () Sim → Agente: _____ • Reativação recente ou corrente de infecção causada por citomegalovírus? () Não () Sim • Outra infecção ativa neste momento? () Não () Sim → Agente: _____ • Paciente apresenta: () SIDA () Outra imunodeficiência → Qual? _____ () Autoimunidade → Qual? _____ () Doença de Ervorto versus Hospediro → () Aguda () Crônica • Sinais/sintomas presentes relacionados a suspeita de infecção fúngica do trato respiratório baixo () Atrito pleural () derrame pleural () Tosse () Dor torácica () Dispneia () Hemoptise • Tomografia computadorizada (TC) do tórax realizada? () Não () Sim Achados na TC: () sinal denso, lesão(s) bem circunscritas, <u>com halo</u> () sinal denso, lesão(s) bem circunscritas, <u>sem halo</u> () sinal de ar crescente () cavidade Outro sinal de infiltrado: _____ • Sinais/sintomas presentes relacionados a suspeita de infecção fúngica sinusal: () Sintomas do trato respiratório superior (ex. corrimento nasal, congestão) () Ulceração ou crosta nasal () Epistaxe () Inchaço periorbital () Sensibilidade maxilar () Lesões necróticas negras () Perfuração do palato duro • Alguma evidência radiológica sugestiva de infecção fúngica sinusal? () Não () Sim • Algum teste direto realizado como critério micológico na suspeita de doença fúngica invasiva na última semana? () Não () Sim () Análise histopatológica/citopatológica () Microscopia direta () Culturas Anamnese/Resultado: _____		
<ul style="list-style-type: none"> • Paciente é submetido à diálise? () Não () Sim • Uso de análogos de nucleosídeos durante os últimos 90 dias? () Não () Sim • Prolongado (> 3 semanas) uso de corticosteróide nos últimos 60 dias? () Não () Sim → Nome/dose: _____ • Uso de agente imunossupressor nos últimos 30 dias? () Não () Sim Imunossupressor: () ciclosporina () tacrolimo () ciclofosfamida () micofenolato mofetil () azatioprina () anticorpo monoclonal específico: _____ • Outros(s): _____ • Antifúngicos em uso: () fluconazol () itraconazol () anfotericina B () voriconazol () caspogungina () isavuconazole () posaconazol • Antibióticos em uso: () ampicilina - sulbactam () piperacilina - tazobactam () amoxicilina - ac. clavulânico 		
_____ Solicitante		Data: ___/___/___

APÊNDICE B

Universidade Federal da Bahia

Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Diretoria Adjunta de Ensino e Pesquisa (DAEPE)

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Rua Augusto Viana, s/n – Canela Salvador – Bahia Cep – 40.110-060
Tel. (71) 3283-8140 FAX (71) 3283-8141
E-mail: cep_hupes@gmail.com

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO**PROTOCOLO CEP – 027/2009**

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPE S) avaliou o projeto descrito abaixo

Projeto de Pesquisa: Imunodiagnóstico Precoce da Infecção por Citomegalovírus e por *Aspergillus* spp. em Pacientes Hematológicos Imunossuprimidos

Pesquisador Responsável: Fernanda Washington de Mendonça Lima

Data do Parecer: 27.08.2009

Parecer: Projeto Aprovado

Atenciosamente,


ROBERTO BADARÓ, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

Resolução CNS 196/96 Item IX.2 letra c
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final de seu projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor (a):

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), de um projeto intitulado “**Imunodiagnóstico Precoce da Infecção por Citomegalovírus e por *Aspergillus spp.* em Pacientes Hematológicos Imunossuprimidos**”. A pesquisa tem o objetivo de monitorar pacientes, através de exames laboratoriais periódicos, quanto à infecção pelo Citomegalovirus e pelo *Aspergillus sp.*, dois agentes que causam importantes infecções em indivíduos imunossuprimidos.

Caso o senhor (a) concorde em participar da pesquisa, permitirá a coleta de 10mL de sangue semanalmente durante períodos de neutropenia, nos quais há maior susceptibilidade à infecção invasiva por espécies do fungo *Aspergillus sp.*

O sangue coletado será devidamente acondicionado e encaminhado ao Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas (SIDI) da Universidade Federal da Bahia – UFBA para a realização dos testes laboratoriais.

O resultado dos seus exames será encaminhado ao Centro de Transplante de Medula Óssea (CTMO) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) para que seja avaliado pela equipe médica responsável.

A participação na pesquisa é voluntária e o senhor (a) não terá nenhum custo ou remuneração especial. O senhor (a) poderá desistir de participar da pesquisa em qualquer momento que desejar, sem que isto lhe cause qualquer problema.

Como responsável por este estudo, prometo manter em segredo todos os dados individuais informados, bem como indenizá-lo (a) se sofrer algum prejuízo por causa desta pesquisa. Assim, se está claro para o senhor (a) a finalidade desta pesquisa e se aceita participar dela peça que assine este documento.

Fernanda Washington de M. Lima - Pesquisadora Responsável.

Contato: (71) 3237 1912 (Pesquisadora) / (71) 3283 6956 (SIDI) / (71) 3235 6562 (CTMO/HUPES)

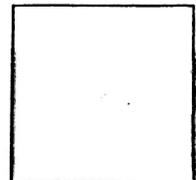
Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Universitário Professor Edgard Santos – UFBA

Rua Augusto Viana, s/nº - Canela, Salvador-BA. Fone: (71) 3283 8140

Eu, _____, aceito participar da pesquisa intitulada “**Imunodiagnóstico Precoce da Infecção por Citomegalovírus e por *Aspergillus spp.* em Pacientes Hematológicos Imunossuprimidos**”. Confirmando que fui devidamente informado dos objetivos e da utilidade da presente pesquisa. Foi-me garantido que posso deixar de participar a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade, e que os resultados serão tratados confidencialmente.

Local e data: _____, ____/____/____

Assinatura



ANEXO A – Características gerais e clínicas dos episódios de neutropenia excluídos.

Tabela 10. Características gerais dos episódios de neutropenia excluídos do estudo.

Características	Nº
Total	49
Idade	
Média	43
Mediana (faixa)	42 (16-63)
Sexo	
Masculino	22
Feminino	27
Doença de base	
LMA	7
LLA	6
LMC	-
LLC	1
LH	3
LNH	12
MM	10
Outra	10
TMO	
Autólogo	14
Alogênico	1
Status da doença	
Remissão	21
Recidiva	19
Fase atual da quimioterapia	
Indução	23
Consolidação	13
Doença enxerto versus hospedeiro	-
Dias de neutropenia ao início do monitoramento	
Média	8
Mediana (faixa)	4 (1-30)
Dias de neutropenia ao final do monitoramento	
Média	-
Mediana (faixa)	-
Febre durante o episódio	
Sim	12
Não	37
Uso prolongado de corticosteróide	1

LMA, leucemia mielóide aguda; LLA, leucemia linfóide aguda; LMC, leucemia mielóide crônica; LLC, leucemia linfóide crônica; LH, linfoma de Hodgking; LNH, linfoma não Hodgking; MM, mieloma múltiplo.

ANEXO B – Produtos acadêmicos e científicos gerados.



10 Anos
Infocus
América Latina 2011

X Fórum de Infecções Fúngicas na Prática Clínica

28 e 29 de outubro de 2011
Hotel Maksoud Plaza - São Paulo - Brasil

INFOCUS: 10 anos de história em Micologia Médica

Certificado

Certificamos que **Kelly Cristine Moura Costa Pedroza , Sócrates Bezerra de Matos , Marco Aurelio Salvino de Araujo , Mônica Botura , Tiago Thalles de Freitas , Roberto José Meyer Nascimento , Fernanda Washington de Mendonça Lima** participou do **X Fórum de Infecções Fúngicas na Prática Clínica** com o trabalho: **Antigenemia seriada para detecção de galactomanana no diagnóstico da aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos no estado da Bahia, Brasil**

São Paulo, 28 e 29 de outubro de 2011.



Marcio Nucci
Coordenador do INFOCUS 2011



Arnaldo Lopes Colombo
Coordenador do INFOCUS 2011

Apoio:





XXXVII Congress of the Brazilian
Society of Immunology
V Extra Section of Clinical Immunology - ESCI



Campos do Jordão SP Brazil
October 20-24, 2012

Certificate

This is to certify that

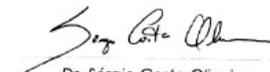
presented the **POSTER** entitled:

"GALACTOMANNAN ANTIGENEMIA SCREENING IN NEUTROPENIC PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL DISEASES IN BAHIA STATE, BRAZIL"

AUTHORS: "KELLY CRISTINE MOURA COSTA PEDROZA; SÓCRATES BEZERRA DE MATOS; MÔNICA BOTURA; MARCO AURÉLIO SALVINO; TIAGO THALES; ROBERTO JOSE MEYER ; FERNANDA WASHINGTON DE MENDONÇA LIMA"

during a **Poster Session** in the XXXVII CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY
V EXTRA SECTION OF CLINICAL IMMUNOLOGY
Campos do Jordão, Brazil

October 24th, 2012



Dr. Sérgio Costa Oliveira
President

Reproducibility of Positive Results for the Detection of Serum Galactomannan by Platelia™ *Aspergillus* EIA

Kelly C. M. C. Pedrosa · Sícrates B. de Matos · Daniel L. de Moura ·
 Mônica B. B. Oliveira · Marcos A. S. Araújo · Roberto J. M. Nascimento ·
 Fernanda W. M. Lima

Received: 8 December 2012 / Accepted: 31 May 2013
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Galactomannan (GM) was recently included in consensus guidelines as an indirect mycological criterion for the diagnosis of invasive aspergillosis. Currently, there is an enzyme immunoassay available to detect GM in biological samples, the Platelia™ *Aspergillus* EIA. In this study, the reproducibility of positive results obtained using this assay was evaluated using serum samples from neutropenic patients. A trend toward lower values was observed, and 55 % (27/49) of positive results were negative after retesting. A low reproducibility of positive results for the detection of GM in serum was observed.

Keywords Aspergillosis · ELISA · Galactomannan · Reproducibility · Serum

Introduction

Invasive aspergillosis (IA) is a major invasive fungal infection (IFI) in patients with hematological disorders, and the incidence of this life-threatening complication has increased in neutropenic patients and hematopoietic stem cell transplant recipients in recent years [1, 2].

The difficulty of diagnosing IFI has led to the development of a consensus by the European organization for research and treatment of cancer and mycoses study group, which defines the disease as “proven,” “probable” or “possible,” based on host factors and clinical and mycological criteria. Recently, the consensus was reviewed, and the detection of the antigen galactomannan (GM) in biological samples using an indirect test was included as a mycological criterion for the diagnosis of aspergillosis [3].

Galactomannan is a heat-stable heteropolysaccharide released from hyphae during fungal growth in tissues. Previously, GM was detected using the latex agglutination test, and currently, GM is detected using a commercially available sandwich enzyme immunoassay (EIA). This EIA has been in use in Europe for more than 10 years and has been approved for use in the United States. In Brazil, the national regulatory agency (ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária) approved its use in 2007 [4, 5].

The GM EIA has been an important tool for the early diagnosis of infection, with a sensitivity of 67–100 %, a specificity of 81–99 %, a positive

K. C. M. C. Pedrosa (✉) · S. B. de Matos ·
 D. L. de Moura · F. W. M. Lima
 Immunology Service of Infectious Diseases (SIED),
 Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil
 e-mail: kellypedrosa@hotmail.com

M. B. B. Oliveira · M. A. S. Araújo
 Hematology Service, Federal University of Bahia,
 Salvador, Bahia, Brazil

R. J. M. Nascimento
 Laboratory of Immunology and Molecular Biology,
 Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

Published online: 13 August 2013

Springer

predictive value of 87.5 % and a negative predictive value (NPV) of 98.5 % for neutropenic patients [6, 7].

This work aimed to evaluate the reproducibility of positive results for the detection of galactomannan in serum from patients with hematological diseases.

Materials and Methods

We analyzed 307 serum samples from neutropenic patients (neutrophil count < 500/ μ L) collected between May 2011 and July 2012 at the Hematology Service of the Federal University of Bahia, Brazil. All patients had diagnosed hematological malignancies and were treated with immunosuppressants. The serum GM level was measured using the Platelia *Aspergillus* EIA kit (Bio-Rad, France), according to the manufacturer's instructions. These assays were performed by the Immunology Service of Infectious Diseases (ISID), and each sample with a positive result was retested. All samples were stored at 20 °C until the GM retesting.

Optical densities (OD) were read at 450 and 620 nm, and the OD indexes were calculated using the cut-off values obtained by samples provided with the kit. A result was considered positive when the OD index was ≥ 0.5 in accordance with kit's instructions.

The Platelia™ *Aspergillus* EIA test was used in conjunction with results of chest computed tomography to aid in the diagnosis of invasive aspergillosis.

Results and Discussion

The general characteristics related to the samples are presented in Table 1. A total of 49 serum specimens were retested. Figure 1 is a graphical representation of the reproducibility, with the results of the initial galactomannan tests (GM1) on the horizontal axis and the results of the repeat galactomannan tests (GM2) on the vertical axis.

For 73 % (36/49) of positive samples, the second galactomannan test (GM2) gave an OD index lower than the index determined by the first test (GM1), and 55 % of positive samples were negative according to the second test (Table 1). The results of the repeated tests of positive samples were lower by an average of -0.84 OD index points. Only 16 % (8/49) of results for the retested samples were the same as the initial

Table 1 Characteristics of the positive samples for the first and second tests

Number of retested samples	49
Average of GM1 OD indexes	1.21
Average of GM2 OD indexes	0.71
Comparison of OD indexes in GM2 with GM1	
Lower	73 % (36/49)
Same	16 % (8/49)
Higher	10 % (5/49)
Result status in GM2	
Positive	45 % (22/49)
Negative	55 % (27/49)
Average time between GM1 and GM2, days	7 (median 6; range 1–16)

GM1: First galactomannan testing; GM2: Second galactomannan testing

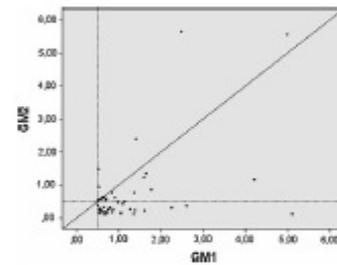


Fig. 1 Graphical representation of the reproducibility of the EIA showing the galactomannan (GM) indexes of the first (GM1) and second (GM2) tests. The dashed line represents the cutoff value, and the solid line represents the ideal trend for reproducibility

results; the results of GM2 were considered the "same" when they were in the range of ± 10 % of the results for GM1. In some cases (10 %), the OD index increased. The observed trend toward lower GM values in the second test is in accordance with the results of other authors, who have reported that 48, 65 and 40 % of samples were negative when 29, 34 and 67 positive samples, respectively, were retested [8–10]. Of the 49 samples, two were from a patient with a clinical picture compatible with probable IA, and five were from a patient that presented followed positive

results, an episode that may represent an earlier stage of infection [11].

The duration of sample storage can influence the performance of the GM test [5, 12]; however, in this study, we showed that there was no significant difference in the average storage time between the groups that remained positive and became negative in GM2 (Mann-Whitney test, $p = 0.3412$). In addition, there was no correlation between the storage time and the reduction in the OD index (Spearman's correlation, $p = 0.769$).

Despite the lack of influence of the time storage on our results, the time prior to retesting should be as short as possible to achieve a prompt diagnosis and provides suitable treatment.

It is important to repeat every positive test due to the possibility of contamination during sample handling; however, contamination does not explain the greater number of positive results for the first test because all samples were obtained in vacuum collection tubes and all procedures were conducted in laminar flow cabinet in a standardized manner.

In the last decade, there have been remarkable advances in IA diagnosis due to the use of GM detection, which is a non-culture-based method. This test is especially useful due its high NPV, which enables clinicians to exclude IA from the differential diagnosis for critical patients. Moreover, the GM levels in biological fluids allow early diagnosis, the provision of appropriate therapy and the monitoring of therapy after diagnosis. Nevertheless, there are few data on the reproducibility of the GM EIA, and the trend toward lower OD indexes highlights the need for the retesting of all positive samples to avoid diagnoses and treatments based on false-positive results because there this test has a low reproducibility. More data about the performance of the GMEIA are required to optimize the usefulness of the detection of GM.

Acknowledgments FAHESB, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Bahia; CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; ISID/Federal University of Bahia.

References

- Racić Z, Kocmanova I, Tonkova M, Barcova I, Wainbergova B, Lengrova M, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases—the role of factors affecting assay performance. *UIDR*. 2011; 15:874–81.
- Hadrich I, Makni F, Cheikhrouhou F, Neji S, Amouri I, Sellami H, Tenbeldi H, Bellag H, Ellozmi M, Ayadi A. Clinical utility and prognostic value of galactomannan in neutropenic patients with invasive aspergillosis. *Pathol Biol*. 2012;60(6):357–61.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections collaborative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1813–21.
- ANVISA. Resolução nº 32/08, de 19 de outubro de 2007. Available at: http://www.anvisa.gov.br/cgip/diagnostico/221007_aplicativo_1.pdf. Accessed on 12-Oct-2012.
- Aquino VR, Ozkanli EZ, Paupolotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia*. 2007;163:191–202.
- Amano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kato S, Shinohara A, Nakamura H, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan antigenaemia after haematopoietic stem cell transplantation. *JAC*. 2008;61:411–6.
- Martins JA, Klent R, Mason C, Theunissen K, Meersman W, Lagrou K, et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *CID*. 2007;44:329–33.
- Bizzini A, Marchetti O, Meylan P. Response to: lack of intra-laboratory reproducibility in using plasma *Aspergillus* enzyme immunoassay test for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen. *Transpl Infect Dis*. 2012;14:218–9.
- Oren I, Avidor I, Sprecher H. Lack of intra-laboratory reproducibility in using plasma *Aspergillus* enzyme immunoassay test for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen. *Transpl Infect Dis*. 2012;14:107–9.
- Purifano E, Miklikka M, Milichich F, Viccoli C. Galactomannan: testing the same sample twice? *Transpl Infect Dis*. 2012;14:38–9.
- Nacci M, Nouze SA, Grazziatti M, Kanne NS, Barlogie B, Amate E. Probable invasive aspergillosis without pre-specified radiologic findings: proposal for inclusion of a new category of aspergillosis and implications for studying novel therapies. *CID*. 2010;51:1273–80.
- Mermink-Kerem MASH, Donnelly JP, Verweij JE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(6):349–57.