

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

ASPERGILOSE INVASIVA
EM PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA
INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Aluno: Valério Rodrigues Aquino

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto

Tese de Doutorado

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

ASPERGILOSE INVASIVA
EM PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA
INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Aluno: Valério Rodrigues Aquino

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto

Tese de Doutorado

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Aquino, Valério Rodrigues
Aspergilose Invasiva em Pacientes com Doença
Pulmonar Obstrutiva Crônica Internados em Unidade de
Terapia Intensiva / Valério Rodrigues Aquino. --
2011.
xiv 116 f.

Orientador: Alessandro Comarú Pasqualotto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-
RS, 2011.

1. Aspergilose Invasiva. 2. DPOC. 3.
Galactomanana. 4. PCR. I. Pasqualotto, Alessandro
Comarú, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto, que disponibilizou muitas horas do seu trabalho e do convívio com a Daniela, a Clarinha e o valente Artur para se envolver no desenvolvimento e lapidação deste trabalho. Agradeço de coração e obrigado pela oportunidade.

Ao programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Pneumológicas, pela acolhida, apoio e tranquilidade proporcionada para desenvolvimento do trabalho e realização de disciplinas.

Ao Prof. David Denning, que modificou o curso do artigo levantando hipóteses, analisando e revisando os dados de uma “modesta série”. Uma grande honra ter essa contribuição tão qualificada.

A Prof. Dr. Afonso Luís Barth, pela amizade, apoio, oportunidades e incentivo em buscar qualificação profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Severo (o mestre), que sempre admirei como profissional e as circunstâncias me proporcionaram o convívio e aprendizado de micologia juntamente com sua equipe do Laboratório de Micologia da Santa Casa (Flávio, Cecília, Luciana...).

Aos colegas da Unidade de Microbiologia do HCPA (Dr. Berno, Izolete, Larissa, Denise, Denisinha, Dirce, Kátia, Dani, Vanessa, Eliane, Vera, Diva, Ana Paula, Cleusa, Maria, Paulo André, Sandra, Taiana e Patrícia) que com competência fazem um trabalho diferenciado dentro do Serviço de Patologia Clínica.

Aos funcionários dos laboratórios de Biologia Molecular do HCPA (Fernanda, Alice) e Santa Casa (Huander) que me oportunizaram aprender um pouco de PCR em tempo real.

A algumas pessoas que de alguma forma contribuíram, permitiram ou proporcionaram a realização deste trabalho: Prof. Dr. Sergio Pinto Ribeiro, Prof. Dra Silvia Regina Rios Vieira, Prof. Dr. Luciano Goldani, Dr. Fabiano Nagel, Prof. Dra. Melissa Xavier, Prof Dr. José da Silva Moreira, Prof. Dra. Marli Maria Knorst, Marco Aurélio Silva, Médicos e Equipe da Enfermagem da UTI do Pavilhão Pereira Filho e UTI Central.

Aos familiares dos pacientes incluídos no estudo, que num momento difícil de suas vidas permitiram que fossem realizados os procedimentos necessários para a pesquisa.

A Stela que convive com minha inquietude, apoia e gerou a nossa maior riqueza que é nosso filho João Pedro.

Ao João (acima citado) que aos 5 anos não esta nem aí para este trabalho e só quer brincar.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO.....	v
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
<i>SUMMARY</i>	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	2
Doenças Fúngicas Invasivas.....	2
O gênero <i>Aspergillus</i>	4
Principais Formas Clínicas de Aspergilose.....	5
Aspergilose Invasiva.....	8
Aspergilose Invasiva em Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.....	12
Aspergilose Invasiva em Transplante de Órgãos Sólidos.....	16
Aspergilose Invasiva em pacientes não-neutropênicos admitidos em Unidade de Terapia Intensiva.....	17

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica como Fator Predisponente para Aspergilose Invasiva.....	19
Epidemiologia da Aspergilose Invasiva em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.....	24
Fatores de Risco para Aspergilose Invasiva em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.....	27
Dificuldades Diagnósticas de Aspergilose Invasiva em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	30
Aspectos Clínicos.....	31
Exames Radiológicos.....	32
Exame Micológico Direto e Cultivo.....	34
Testes Sorológicos.....	35
Biologia Molecular	40
Critérios Diagnósticos Propostos.....	43
Mortalidade.....	45
REFERENCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	46
JUSTIFICATIVA.....	64
OBJETIVOS.....	65

ARTIGO

Invasive aspergillosis (IA) in ventilated patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a prospective, multicentre study.....66

ANEXOS.....78

Anexo 1: Protocolo Aspergillus - DPOC.....78

Anexo 2: Documento de aprovação do projeto - HCPA.....79

Anexo 3: Termo de Consentimento livre e esclarecido - HCPA.....80

Anexo 4: Documento de aprovação do projeto - Complexo Hospitalar Santa Casa...81

Anexo 5: Termo de Consentimento livre e esclarecido - Comp Hosp Santa Casa.....82

Anexo 6: Documento de solicitação de inclusão de pacientes no estudo.....83

Anexo 7: Detalhamento dos métodos do estudo.....84

Anexo 8: Resultados adicionais do estudo.....107

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 1. Classificação espirométrica dos distúrbios ventilatórios.....	23
Tabela 2. Critérios Bulpa para diagnóstico de AI em pacientes com DPOC.....	44

Anexos

Tabela 1. Características basais dos pacientes incluídos no estudo.....	108
Tabela 2. Doenças associadas.....	109
Tabela 3. Uso de antibióticos.....	110
Tabela 4. Exames.....	111
Tabela 5. Exames bacteriológicos e micológicos.....	112
Tabela 6. Resultados da pesquisa de antígeno galactomanana e PCR.....	113
Gráficos de amplificação do DNA com MycAssay TM <i>Aspergillus</i> (Myconostica)...	114
Gráficos de amplificação (DNA) com <i>Aspergillus</i> spp q-PCR Alert kit (Nanogen)	115
Tabela 7. Dados demográficos e de desfecho.....	116

ABREVIATURAS

ABPA - Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

AI - Aspergilose Invasiva

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CT - *Cycle Threshold*

CVF - Capacidade Vital Forçada

DECH - Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

DFI - Doença Fúngica Invasiva

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EORTC/MSG - *European Organization for Research and Treatment of*

Cancer/Mycosis Study Group

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FDA - *Food and Drug Administration*

GM - Galactomanana

HEPA - *High-efficiency Particulate Air Filter*

LBA - Lavado broncoalveolar

NEMIS - *The National Epidemiology of Mycosis Survey*

NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*

NNISS - *National Nosocomial Infection Surveillance System*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

QT - Quimioterapia

SCOPE - *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance*

TC - Tomografia Computadorizada

TCTH - Transplante de Células Tronco-Hematopoiéticas

UAP - Unidade de Ambiente Protegido

VEF₁ - Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo

RESUMO

Estudos recentes têm sugerido que doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) possa ser um fator de risco para aspergilose invasiva (AI), particularmente no contexto de ventilação mecânica e uso de esteróides. Neste trabalho, realizamos estudo de coorte prospectivo multicêntrico (2009-2010) em três unidades de terapia intensiva no Sul do Brasil. Foram incluídos no estudo pacientes com DPOC que apresentassem novo infiltrado pulmonar enquanto em ventilação mecânica e sob uso de corticosteróides. Para estes pacientes, foram realizados os seguintes testes, em amostras respiratórias (maioria aspirado traqueal): exame micológico direto, cultura quantitativa para fungos, pesquisa de antígeno galactomanana (GM) (Platelia *Aspergillus*) e PCR em tempo real para *Aspergillus*. O DNA das amostras respiratórias foi extraído utilizando-se o kit de extração MycXtra (Myconostica, UK), sendo a amplificação feita com dois kits comerciais de q-PCR: *Aspergillus* spp q-PCR Alert kit (Nanogen, Itália) e MycAssay™ *Aspergillus* kit (Myconostica, UK). Foi também obtido soro destes pacientes, onde foi testada GM, precipitinas para *Aspergillus* e IgE total. O estudo foi aprovado no comitê de ética dos dois hospitais.

Foram incluídos no estudo 47 pacientes (40,4% do sexo masculino), sendo a idade média de 68,6 anos ($\pm 9,9$). A maioria (72,8%) dos pacientes possuía DPOC grave (GOLD III/IV). A dosagem de esteróides (equivalentes de prednisona) variou de 100-4125 mg (mediana: 900 mg). Exame micológico (direto e cultivo) foi positivo para *Aspergillus* seção *Fumigatti* em apenas dois pacientes (4,2%). Outros fungos identificados foram *Scedosporium apiospermum* (n=1) e *Histoplasma capsulatum* (n=1). Precipitinas para *Aspergillus* foram positivas em três pacientes, com títulos baixos (<1:2). Os níveis de IgE variaram de 2 a >3000 UI/ml (mediana de 74 UI/ml). Em sua grande maioria, os índices de

GM no soro foram $<0,5$, enquanto que nas amostras respiratórias, os índices de GM foram $>0,5$, $>1,0$ e $>1,5$ em 74,5%, 40,5% e 21,3%, respectivamente. PCR da *Myconostica* foi positivo em 10 pacientes, enquanto PCR Nanogen detectou apenas um paciente. A mortalidade geral foi de 53,2%.

Este estudo prospectivo multicêntrico mostrou uma baixa incidência (4,2%) de AI em pacientes com DPOC. A determinação de GM mostrou altos índices nas amostras analisadas (50% com índices ópticos $>1,3$), possivelmente necessitando um maior ponto de corte para excluir resultados falso-positivos. A combinação de PCR e GM para o diagnóstico de AI em amostras respiratórias merece investigação adicional, devido à baixa sensibilidade dos métodos de cultivo observados nos estudos clínicos realizados.

Palavras chave: aspergilose invasiva; *Aspergillus fumigatus*; DPOC; galactomanana.

SUMMARY

Recent data have suggested that chronic obstructive pulmonary disease (COPD) may be an important risk factor for invasive aspergillosis (IA), particularly in the context of mechanical ventilation (MV) and therapy with corticosteroids. Here we present the results of a prospective multicentric study (2009-2010) conducted in three intensive care units (ICUs) in Southern Brazil. COPD patients on steroids showing a new lung infiltrate while on mechanical ventilation were included and the following tests were performed in respiratory samples (mostly tracheal aspirates): microscopy, quantitative fungal culture, galactomannan (GM) (Platelia *Aspergillus* EIA) and real-time PCR to detect *Aspergillus* DNA. DNA was extracted using MycXtra kit (Myconostica, UK) and amplification was performed using two q-PCR commercial kits: *Aspergillus* spp q-PCR Alert kit (Nanogen, Italy) and MycAssayTM *Aspergillus* kit (Myconostica, UK). Serum was also obtained and tested for *Aspergillus* precipitins, GM and total IgE levels. Ethical approval was obtained in each of the participant hospitals.

A total of 47 patients were enrolled in the study (male 59.6%). Mean age was 68.6 years-old (\pm 9.9). Most patients had severe COPD (GOLD stages III/IV in 72.8%). Steroid dosage (prednisone equivalent) ranged from 100-4125 mg (median 900 mg). Microscopy and culture were positive for *Aspergillus* section *Fumigatti* in only 2 patients (4.2%). Other fungi included *H. capsulatum* (n=1) and *S. apiospermum* (n=1). *Aspergillus* precipitins were positive for three patients, at low titers (\leq 1:2). IgE levels ranged from 2 to >3,000 IU/ml (median 74 IU/ml). All serum GM indexes were <0.5 and respiratory samples, GM indexes of \geq 0.5, \geq 1.0 and \geq 1.5 were observed in 74.5%, 40.5%, and 21.3%, respectively. Myconostica PCR was positive in 10 patients, while Nanogen PCR detected only one patient. Overall mortality was 53.2%.

This prospective multicenter study showed a low incidence (4.2%) of IA in critically ill patients with COPD. High optical indices were observed when GM was tested in respiratory samples (50% of the results showed indices of >1.3). Therefore, the test did not discriminate IA and a higher cutoff would be needed to exclude false-positive results. The combination of PCR and GM for the diagnosis of IA in respiratory samples deserves further investigation due to the low diagnostic sensitivity of the classical mycology methods.

Key words: Invasive aspergillosis; *Aspergillus fumigatus*; COPD; galactomannan.

INTRODUÇÃO

Aspergilose invasiva (AI) é uma grave condição que afeta pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com neutropenia prolongada. A alta mortalidade nestes pacientes é atribuída principalmente ao diagnóstico tardio e à baixa sensibilidade dos métodos tradicionais de diagnóstico como microscopia e cultivo. Embora a histopatologia seja considerado o método padrão-ouro para diagnóstico de aspergilose, a realização dos procedimentos médicos invasivos é muitas vezes dificultada pela presença de trombocitopenia nestes pacientes. Recentemente, um número crescente de estudos tem demonstrado a utilidade de testes não-invasivos no diagnóstico de aspergilose, em especial através da detecção da galactomanana (GM) e pela reação da cadeia polimerase (PCR). Entretanto, dados sobre o desempenho destes testes em indivíduos não-neutropênicos são ainda escassos.

Na ausência de neutropenia prolongada, as equipes médicas usualmente não suspeitam de AI. Consequentemente, a combinação de um baixo índice de suspeição, somado com as já referidas dificuldades diagnósticas, faz com que este diagnóstico seja frequentemente esquecido em unidades de terapia intensiva (UTI). Entretanto, estudos recentes mostram que AI não é rara em pacientes criticamente enfermos, nos quais a incidência da infecção pode variar entre menos de 1% até 24%. Pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) recebendo corticosteróides parecem ter um risco mais elevado para o desenvolvimento de AI, em comparação com outros pacientes não-neutropênicos admitidos em UTI. Poucos dados estão disponíveis sobre a incidência de AI neste grupo e, desta forma, a melhor estratégia para estabelecer o diagnóstico nestes pacientes permanece incerta. Além disso, é pouco conhecida a epidemiologia da AI em pacientes internados em UTI nos hospitais brasileiros.

REVISÃO DA LITERATURA

DOENÇAS FÚNGICAS INVASIVAS

As doenças fúngicas invasivas (DFI) cresceram marcadamente em importância na prática clínica nas últimas décadas. A causa para esse fenômeno é multifatorial. Primeiramente, houve um aumento na proporção de indivíduos sob risco devido a diferentes regimes de imunossupressão, incluindo uso de drogas citotóxicas, terapia com corticosteróides e transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) e de órgãos sólidos. Além disso, o advento de intervenções médicas agressivas tem permitido que muitos pacientes criticamente enfermos sobrevivam por mais tempo, aumentando desta maneira o risco de infecções fúngicas nestes pacientes. A emergência de síndromes associadas a estados de imunossupressão, como a AIDS, também resultou em aumento na incidência das micoses. Atualmente, as equipes médicas parecem estar mais cientes da possibilidade de fungos estarem causando doenças graves em pacientes imunocomprometidos. O uso de antimicrobianos de amplo espectro pode predispor a infecções fúngicas ao modificar a microbiota residente de pele e mucosas, criando uma condição favorável para o crescimento de fungos, em um ambiente menos competitivo (1).

Espécies pertencentes aos gêneros *Candida* e *Aspergillus* são responsáveis pela maioria das micoses vistas em clínica médica (2). Embora *Candida* spp. sejam as principais etiologias de micose em humanos (3), muitos centros têm relatado uma marcada redução na incidência de infecções de corrente sanguínea causadas por espécies de *Candida* nas últimas décadas, provavelmente devido ao maior uso de profilaxia com fluconazol (1,4). Em contraste, um aumento na incidência de infecção por fungos filamentosos, particularmente aspergilose invasiva, tem sido descrito em diversos hospitais terciários,

onde são realizadas necropsias (5-8).

O GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* compreende uma grande variedade de espécies que estão amplamente distribuídos na natureza, particularmente no ar, material orgânico em decomposição, solo, água, alimentos, superfícies e sistemas de ventilação. Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam conidiogênese enteroblástica tipo fialídica e possuem alta capacidade de esporulação. No ar atmosférico encontramos em torno de 1-100 conídios por m³ (9,10). Esses fungos possuem estruturas características de reprodução, incluindo conidióforo, fiálides, vesícula e conídios, as quais permitem com facilidade que os mesmos sejam identificados em nível de gênero. A espécie mais frequentemente envolvida com DFI é o *Aspergillus fumigatus*, fungo termotolerante que apresenta conídios de pequeno diâmetro (2-3 µm), o que favorece a chegada aos alvéolos pulmonares distais.

Com o avanço das ferramentas moleculares, a taxonomia dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* tem sido modificada de modo considerável. O gênero *Aspergillus* situa-se no filo *Ascomycota*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*. A determinação da espécie de *Aspergillus* tem sido frequentemente revista, com base em novos achados de sequenciamento genômico, aliados a características fenotípicas e filogenéticas, de acordo com o “conceito polifásico” de definição de espécie. Assim, “*Aspergillus fumigatus*”, “*Aspergillus flavus*” e “*Aspergillus niger*” passaram a ser tratados como complexos (ou seções), onde diversas espécies se inserem, com diferente potencial patogênico e perfil de suscetibilidade às drogas antifúngicas. Desta forma, *Aspergillus* seção *Fumigati*, *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri* são terminologias que atualmente têm sido utilizadas na literatura (10-14).

PRINCIPAIS FORMAS CLÍNICAS DE ASPERGILOSE

As espécies de *Aspergillus* podem causar uma variedade de manifestações clínicas, desde processos alérgicos até infecções generalizadas, resultando em alta mortalidade. O grau de acometimento varia de acordo com a imunidade do hospedeiro, a quantidade de inóculo e da virulência do microrganismo (15).

O espectro da aspergilose pode ser didaticamente dividido em três categorias principais: **doença alérgica** (incluindo rinossinusite fúngica alérgica, aspergilose broncopulmonar alérgica, asma grave com hipersensibilidade a fungos e alveolite alérgica extrínseca), **formas cavitárias crônicas** (que usualmente envolve pacientes imunocompetentes que possuem dano estrutural prévio ao parênquima pulmonar) e **doença invasiva** (podendo ser rapidamente evolutiva ou apresentar curso subagudo ou mesmo crônico, na dependência da imunidade do paciente). Grande sobreposição é observada, no entanto, entre as diversas formas clínicas de aspergilose, que costumam envolver primariamente os pulmões, seguido em frequência pelos seios paranasais (15,16).

Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) é uma reação de hipersensibilidade ao micélio do *Aspergillus* que coloniza os brônquios (17), com manifestação clínica semelhante à asma. Estima-se que a doença acometa 1-2% nos pacientes com asma e até 15% dos pacientes com fibrose cística. Porém, nas últimas duas décadas parece ter havido aumento dessa prevalência, especialmente por uma maior suspeita diagnóstica e disponibilidade de ensaios sorológicos (17-19). Embora o diagnóstico de asma ou fibrose cística seja usualmente requerido para definir a presença de ABPA (18), a doença tem também sido descrita em outros contextos, particularmente em indivíduos expostos a fontes ambientais de *Aspergillus*; por exemplo, quadros compatíveis com ABPA têm sido descritos em trabalhadores de usina de cana de açúcar, assim como casos de ABPA por

Aspergillus oryzae em família de trabalhadores em pequenas fábricas de produtos de soja. Apesar da ausência de asma, estes pacientes tiveram *Aspergillus* sp isolado em amostras de escarro, além de reações cutâneas positivas e presença de anticorpos do tipo IgE (20). Em um recente estudo, Agarwal *et al.* demonstraram que 8,5% dos pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) tinham hipersensibilidade a antígenos de *Aspergillus*; 1% preencheria critérios para ABPA, sugerindo que DPOC possa ser uma condição predisponente para aspergilose alérgica (21).

Já a aspergilose pulmonar cavitária crônica costuma ocorrer em pacientes com tuberculose pulmonar prévia, que tenha resultado em cavidades pulmonares residuais. De modo semelhante, outras doenças que promovam dano estrutural ao parênquima pulmonar, incluindo enfisema, sarcoidose, bronquiectasias, cistos brônquicos, neoplasias, infecções pulmonares e mesmo ABPA, podem complicar com aspergilose pulmonar cavitária crônica (22). Independente da etiologia, estes pacientes costumam se apresentar com um curso crônico de fadiga, tosse produtiva e perda de peso, podendo evoluir para fibrose pulmonar e mesmo óbito. Comumente, estes pacientes mostram evidência radiológica de massas intracavitárias, também chamadas de bola fúngica ou aspergiloma. A razão pela qual alguns pacientes mantêm doença estável ao longo dos anos, sem haver formação de novas cavidades, permanece sendo motivo de estudo, e possivelmente se deva a fatores relacionados à imunidade inata (22,23). Embora esta condição seja conceitualmente entendida como doença não invasiva, pacientes com graus leves de imunossupressão, seja por doenças como diabetes melito ou pelo uso de corticosteróides, podem evoluir para doença invasiva subaguda, também conhecida na literatura como “aspergilose semi-invasiva” ou “aspergilose pulmonar necrosante crônica”.

Em outro pólo da doença, a AI costuma ocorrer em pacientes que possuam um grau mais acentuado de imunossupressão, particularmente neutropenia prolongada e

corticoterapia crônica, em altas doses. Tais condições favorecem que *Aspergillus* desenvolva-se como patógeno oportunista, com intenso tropismo por vasos sanguíneos, resultando em trombose com extensas áreas de infarto e necrose tecidual (11). Por ser o foco deste trabalho, maior ênfase será dada à AI, nos tópicos subsequentes.

ASPERGILOSE INVASIVA

AI é a mais frequente infecção por fungos filamentosos que acomete pacientes imunossuprimidos, resultando em elevada mortalidade. Particularmente em centros de hematologia e transplante, AI tornou-se a principal doença fúngica a partir da década de 90 (5,7,24).

De modo semelhante às outras apresentações de aspergilose, as espécies mais frequentemente envolvidas pertencem à seção *Fumigati*. Em estudo com 218 infecções em 24 centros de transplante nos Estados Unidos, 67% foram causados por fungos reportados como *A. fumigatus*, seguido por *A. flavus* (13%), *A. niger* (9%), e *A. terreus* (7%). Estes dados contrastam com os dados epidemiológicos de uma década antes, quando a grande maioria dos casos (90%) foram devidos a *A. fumigatus* (25), refletindo mudanças na epidemiologia, bem como disponibilidade de métodos de identificação mais elaborados. Entre os fatores que parecem impactar a distribuição destas espécies, destacam-se variáveis ambientais, incluindo o aumento do número de conídios no ar provocados por construções, tempestades e a pressão exercida pelo uso de drogas antifúngicas.

A epidemiologia das infecções por fungos filamentosos tem também sofrido transformações nos anos recentes, associado a um uso mais ampliado de regimes de profilaxia antifúngica, o que pode ser exemplificado pela associação entre uso profilático de voriconazol e a emergência de zigomicose (26,27).

A epidemiologia destas infecções é ainda pouco conhecida na América Latina (28,29). Embora a epidemiologia da candidemia seja bem documentada no Brasil nos últimos 10 anos (30-32), os dados sobre epidemiologia de fungos filamentosos no Brasil são ainda raros (33,34).

A principal via de aquisição de AI é a inalação dos conídios, processo este facilitado

pelo pequeno tamanho apresentado por algumas espécies, especialmente o *A. fumigatus* (<5 µm), bem como pela capacidade dos mesmos de alcançar grandes concentrações no ar durante obras e reformas, podendo ser facilmente dispersos pelo ar. Após inalados, os conídios podem colonizar as vias aéreas, com potencial para causar doença invasiva. O estado imunológico do hospedeiro é fundamental para remover os conídios do trato respiratório, primariamente através de macrófagos. Ao sobrepor as vias de defesa do sistema imune inato, o fungo pode se reproduzir, formando filamentos (hifas) que, no hospedeiro suscetível, possuem grande potencial para causar angioinvasão, resultando em áreas de infarto e necrose tecidual (9). Fatores microbianos podem também influenciar o desenvolvimento de AI, incluindo a produção de toxinas, proteases e metabólito secundários, que exercem múltiplos efeitos sobre a imunidade local e sistêmica do hospedeiro (35). Portanto, a ocorrência de AI depende de uma combinação de fatores, incluindo aspectos relacionados à imunidade do paciente, falha na eliminação de conídios e produção de reação inflamatória ineficiente, com sobrevida da célula fúngica.

Os principais grupos de risco para AI são pacientes com neutropenia prolongada ou submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), especialmente transplante alogênico (18,36-39). Patterson e cols, em estudo envolvendo 595 pacientes com AI (provado/provável), TCTH foi o fator de risco mais frequente (32%, sendo alogênico em 25% dos casos), seguido de neoplasia hematológica (29%), transplante de órgão sólido (9%), doença pulmonar (9%) e AIDS (8%). Em 2% dos pacientes não foi encontrado grupo de risco (39). Assim, em adição a TCTH, diversos outros grupos de pacientes encontram-se também sob risco de AI, incluindo pacientes submetidos a regimes quimioterápicos para tratamento de tumores sólidos, transplantados de pulmão (39,40), pacientes com AIDS, doenças granulomatosas e receptores de terapias supressoras para o tratamento de doenças autoimunes (41-43). Fatores genéticos são também de grande

importância neste processo, particularmente polimorfismos em gene da imunidade inata (34,44). O uso de corticosteróides destaca-se como um importante fator e risco para AI. Em transplantados alogênicos, a incidência de AI associa-se com a dose máxima de corticosteróides empregada, usualmente no contexto de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (25).

As manifestações clínicas da AI são pouco específicas, podendo variar de acordo com a condição predisponente. A manifestação mais frequente é a febre que não responde ao uso de antimicrobianos, especialmente em uma fase inicial. Ao longo do curso da doença, podem surgir dor pleurítica, dispnéia e hemoptise (45). Radiologicamente, pode-se observar o sinal do halo, caracterizado por uma imagem nodular envolto por halo de baixa atenuação. Eventualmente, pode-se haver imagem triangular subpleural, de base voltada para a pleura e vértice direcionado ao hilo, correspondendo a imagem de infarto pulmonar (46-48). Mais tardiamente (em especial quando da recuperação de neutrófilos em paciente neutropênico), observa-se uma lesão caracterizada pela cavitação do nódulo, denominada crescente de ar (48).

Histopatologicamente, a AI é caracterizada em neutropênicos pela invasão tecidual, com subsequente infarto e necrose do tecido por hifas de *Aspergillus* sp. Presumivelmente, os componentes de superfície de células fúngicas se ligam aos componentes da parede vascular, incluindo membrana basal, matriz extracelular, e constituintes celulares, e pode causar isquemia e infarto de estruturas distal às artérias invadidas (10,49). Uma vez que os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem colonizar a via aérea, comprovação histopatológica de invasão tecidual é requerida para que se estabeleça o diagnóstico de certeza de AI (38). Na prática clínica, tecidos são comumente não obtidos para estudo histopatológico, uma vez que muitos destes pacientes são plaquetopênicos. Quando da realização de biópsias, é extremamente importante enviar parte do material para estudo

microbiológico, para isolamento do fungo em cultivo.

Frente às dificuldades em se diagnosticar AI, a mortalidade associada a esta condição tem sido consideravelmente alta. Estima-se que 20-80% dos casos de aspergilose não sejam diagnosticados *ante mortem*, frequentemente devido à falta de suspeita clínica (5,50-52). Estudo conduzido no complexo hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre demonstrou que 82% dos casos de aspergilose não foram diagnosticados antes da necropsia (53).

ASPERGILOSE INVASIVA EM TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

O TCTH constitui uma modalidade terapêutica para diversas doenças que acometem o sistema linfóide ou mielóide, incluindo anemia aplásica e imunodeficiências combinadas, bem como casos de talassemia ou de neoplasias hematológicas (mielodisplasia, leucemia ou linfoma). Após a realização de um transplante, a sobrevida dos pacientes passa a ser determinada de modo importante pela ocorrência de rejeição do enxerto e surgimento de infecções oportunistas. A ocorrência de DECH, requerendo terapia com corticosteróides ou outras drogas imunossupressoras, bem como a infecção por vírus imunomoduladores como o citomegalovírus, podem elevar consideravelmente a chance do paciente desenvolver DFI, o que pode ocorrer tardiamente após o transplante. AI é uma importante causa de morte neste grupo de pacientes (54,55).

A prevalência de AI em pacientes submetidos a TCTH está relacionada ao grau de exposição ambiental aos conídios de *Aspergillus*, bem como à doença de base do paciente, à origem das células tronco e ao regime de condicionamento empregado. Em particular, a duração e profundidade da neutropenia impactam diretamente a frequência de AI nestes pacientes. Até recentemente, o pico de incidência de AI ocorria durante a fase de neutropenia pós-TCTH. Com o advento de regimes não-mieloablativos, reduzindo-se o período de neutropenia (acarretando maior incidência de DECH), AI passou a apresentar distribuição bimodal: em adição à ocorrência precoce pós-TCTH (fase neutropênica), muitos pacientes apresentam AI tardiamente após o transplante, quando da ocorrência de DECH requerendo terapia com corticosteróides (56-58).

Em estudo conduzido pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta), envolvendo 4621 TCTH (43% alogênicos) em 19 centros médicos dos Estados

Unidos, a incidência de AI foi de 0,5-4,8% nos primeiros 4 meses do transplante e de 1,0-7,3% em até 12 meses após transplante (59). *A. fumigatus* foi identificado em 56% dos casos, seguido de *A. flavus* (18,7%), *A. terreus* (16%), *A. niger* (8%) e *A. versicolor* (1,3%). Mais recentemente, estudo do *Transplant Associated Infection Surveillance Network* (TRANSNET) em 2 centros de transplante americanos no período de 2001-2006. Foram documentadas 983 infecções fúngicas invasivas entre 875 receptores de TCTH. A idade média foi de 49 anos e 60% dos pacientes eram do sexo masculino. As infecções mais frequentes foram AI (43%), seguida de candidose invasiva (28%) e zigomicose (8%). Os casos de AI ocorreram com uma mediana de 99 dias após o transplante (58). Em outro estudo de coorte envolvendo 23 centros norte-americanos (*Prospective Antifungal Therapy (Path) Alliance Study*), conduzido entre os anos de 2004 e 2007, 234 receptores de TCTH foram diagnosticados com DFI, dos quais 59% foram casos de AI (60). Grande variabilidade tem sido documentada entre os diferentes centros médicos quanto à incidência de AI, o que pode estar associado tanto a fatores ambientais (61), quanto às doenças de base e intensidade com que os pacientes são investigados.

De modo geral, a maioria dos estudos aponta que pacientes submetidos a transplante autólogo possuem menor risco de AI, em comparação com transplantados alogênicos, o que pode ser justificado pelo menor tempo de neutropenia e menor imunossupressão, entre os primeiros. A incidência de AI em diferentes estudos envolvendo transplantados autólogos tem sido usualmente menor que 3% (25,54,57). Em estudo multicêntrico de coorte brasileiro, apresentado sob a forma de resumo em congresso (29), a incidência de DFI em transplantados autólogos foi de apenas 1% (n=2). Embora o risco de AI em transplantados autólogos ser considerado baixo, um aumento na incidência tem sido observado, especialmente em pacientes com doenças linfoproliferativas em uso de fludarabina ou rituximab (62).

A despeito dos progressos alcançados com terapia antifúngica moderna para AI, associados à possibilidade de um diagnóstico mais precoce desta condição, a mortalidade associada a AI tem sido consideravelmente alta em receptores de TCTH, particularmente transplantados alogênicos (59). No maior estudo clínico randomizado realizado em pacientes com AI (63), a taxa de resposta em transplantados alogênicos foi baixa em ambos os grupos de tratamento (32,4% com voriconazol e apenas 13,3% com anfotericina B deoxicolato). No estudo randomizado AmBiLoad (64), que comparou duas doses de anfotericina lipossomal em pacientes com doença invasiva causada por fungos filamentosos (especialmente AI), a sobrevida em 12 semanas foi de apenas 40% nos transplantados alogênicos, em comparação com 71% para pacientes não-transplantados. Em comparação com estudos realizados nas décadas de 80 e 90 (65), estudos mais recentes têm mostrado taxas menores de mortalidade (25-75%), que se justificam principalmente pelas melhorias no manejo da neutropenia, disponibilidade de drogas antifúngicas mais potentes e menos tóxicas e utilização de marcadores que permitam um diagnóstico mais precoce (54,60,66,67).

Poucos são os estudos epidemiológicos brasileiros avaliando infecções fúngicas invasivas por fungos filamentosos. Em uma coorte que envolveu 8 centros hematológicos no Brasil, Nucci *et al.* (68) demonstraram que a incidência de DFI (casos prováveis e comprovados) em pacientes com leucemia mieloide aguda e em TCTH foi de 43,5% e 8,2%, respectivamente ($p < 0,001$). A maior parte dos casos de DFI foram casos de AI ($n=58$). A epidemiologia local das infecções causadas por fungos filamentosos foi reportada em uma recente publicação, conduzida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O estudo foi conduzido entre 2004 e 2006, anteriormente à implantação da unidade de ambiente protegido, em pacientes hematológicos. Foram estudados 29 pacientes, que em sua maioria (58,6%) tiveram diagnóstico de AI, seguido de fusariose (20,7%) e zigomicose

(13,8%); outros casos incluíam infecções por *Curvularia* sp. e *Trichoderma* sp. (um caso cada, 3,4%). Dezesesseis pacientes (55,2%) haviam sido submetidos a TCTH, incluindo 12 (41,4%) receptores alogênicos e 4 (13,8%) autólogos. Apenas 7 (24,1%) dos pacientes não estavam neutropênicos quando do diagnóstico da doença fúngica. A maioria (n=20; 69,0%) das infecções fúngicas foram classificadas segundo critérios EORTC/MSG como infecção provada por fungo filamentosos, enquanto 9 casos (31,0%) foram diagnósticos prováveis. Os diagnósticos foram realizados através de biópsia dos seios paranasais (n=15; 51,7%), espécimes do trato respiratório (n=9; 31%), hemocultura (n=2; 6,9%), biópsia de pele (n=2; 6,9%) e biópsia de pulmão (n=1; 3,4%). A mortalidade geral foi de 68,9% (33). O conhecimento da epidemiologia local é de fundamental importância para que se faça o uso mais apropriado de terapia empírica. Aspectos interessantes deste estudo incluem a elevada frequência de infecções por fungos não-*Aspergillus* (41,4%), bem como a alta proporção de casos provados de DFI.

ASPERGILOSE INVASIVA EM TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS SÓLIDOS

Nas doenças degenerativas e neoplásicas, o transplante de órgão sólido (TOS) representa uma importante opção no tratamento. O risco de infecções nestes pacientes envolve vários fatores, como a exposição prévia a patógenos oportunistas, infecção pelo citomegalovírus, doença de base do hospedeiro, procedimento cirúrgico realizado, grau de imunossupressão e ocorrência de rejeição. Portanto, a frequência de AI bem como de outras infecções varia de acordo com a modalidade de transplante (25).

Em estudo multicêntrico envolvendo 23 centros de transplantes dos Estados Unidos entre março de 2001 a março de 2006 (*Transplant-Associated Infection Surveillance Network - TRANSNET study*) (69), foram observados 1208 casos de DFI. AI foi responsável por 19% dessas infecções e o tempo de infecção de 184 dias após o transplante (mediana), com variação na incidência de acordo com o órgão transplantado (rim 0,5%, pâncreas 0,5%, fígado 0,9%, coração 2,0% e pulmão 9,1%). Em transplantados de fígado, a prevalência de AI tem variado de 1-4% em diferentes centros, conforme estudo envolvendo 2449 pacientes em 5 centros de transplante nos EUA e Austrália. Por motivos ainda pouco conhecidos, pacientes transplantados de fígado parecem particularmente sujeitos a aspergilose disseminada (70). Frequências menores (0,5-1,2%) tem sido reportadas em transplantados renais (57,70).

Embora a ocorrência de AI seja menos freqüente em TOS do que em TCTH, pacientes transplantado de pulmão possuem risco particularmente elevado (71), com elevada mortalidade. Em estudo na Santa Casa Complexo Hospitalar (72), a incidência de AI em pacientes transplantados de pulmão foi de 13,3%; em transplante unilateral, esta incidência foi de 17,7%. Pacientes que tiveram AI tiveram uma mortalidade 5 vezes maior, em comparação com aqueles sem AI.

ASPERGILOSE EM PACIENTES NÃO-NEUTROPÊNICOS ADMITIDOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI)

Mais recentemente, novos grupos de risco (não hematológicos e não expostos a transplante de órgãos sólidos) para AI estão sendo reconhecidos, entre eles pacientes críticos não-neutropênicos admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI). Vários estudos têm avaliado esta questão (10,49,65,73-76). Por diversas razões, a verdadeira incidência de doença nesses pacientes é de difícil determinação. Primeiramente, a recuperação de *Aspergillus* spp. de cultivo de material respiratório em pacientes não-imunocomprometidos frequentemente representa colonização, sem infecção. Além disso, muitas instituições não realizam estudos de necropsia rotineiramente em pacientes de UTI; conseqüentemente, perdendo muitos diagnósticos *post mortem* (77-79). O desempenho diagnóstico de modernos exames microbiológicos não baseados em cultivo, incluindo testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) e GM, não foi ainda propriamente validado em pacientes não-hematológicos em UTI (74,79). Finalmente, o consenso elaborado pela *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group* (EORTC/MSG) foi criado para contemplar apenas pacientes com câncer e TCTH (38), deixando de fora outras populações onde AI ocorre de modo emergente. Importante salientar que as características radiológicas e sinais de AI estão geralmente ausentes em pacientes não-neutropênicos admitidos na UTI, complicando ainda mais o diagnóstico desta condição.

Apesar das limitações acima apresentadas, a incidência geral de AI em pacientes de UTI tem variado em diferentes estudos de <1% até 24% (6,73,77-84). Por exemplo, em um estudo com pacientes hospitalizados em UTI, foi observado evidência de AI em 6,9% de 1.850 pacientes hospitalizados (73); para 70% destes pacientes, não havia evidência de

doença hematológica de base. Em estudo prospectivo, a incidência de AI entre 110 pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica foi de 24%. Todos os casos foram comprovados por autópsia. Interessantemente, cerca de 2/3 dos pacientes não possuía malignidade hematológica; as principais doenças de base foram doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), cirrose e câncer. Terapia com corticosteróides foi documentada em 58% dos casos. A mortalidade no grupo de pacientes com AI foi de 92% (80).

Embora seja entendido que *Aspergillus* spp. possa causar pneumonia em pacientes de UTI sem fatores predisponentes clássicos, assim como pneumonia comunitária em outros pacientes não imunocomprometidos (85,86), AI talvez seja um dos diagnósticos mais frequentemente esquecidos em UTI (77).

DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA COMO FATOR DE RISCO PARA ASPERGILOSE INVASIVA

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

A DPOC é uma doença caracterizada pela obstrução crônica do fluxo aéreo, com progressão lenta e irreversível. As principais manifestações de DPOC são a bronquite crônica, definida pelo aumento da expectoração em pelo menos três meses/ano durante 2 anos consecutivos e afastada outras causas de expectoração (bronquiectasia, tuberculose, doença fúngica, sinusite crônica, fibrose cística entre outras) e o enfisema pulmonar, caracterizado pelo alargamento anormal e permanente dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, acompanhado de destruição de suas paredes, sem fibrose. Além destas características, o diagnóstico de DPOC relaciona-se com história de tabagismo, capacidade pulmonar alterada, presença de enfisema nos exames de imagem e ausência de melhora objetiva da função pulmonar após uso sistêmico de corticosteróides. A espirometria (teste que avalia a função pulmonar) é um exame de grande importância em pacientes com DPOC, refletindo a gravidade da doença pulmonar. O exame mede os volumes e fluxos durante uma inspiração e expiração completa, podendo ser útil na confirmação do diagnóstico de DPOC. Pacientes com DPOC tipicamente demonstram uma diminuição no VEF₁ (volume expiratório forçado no primeiro segundo) e na razão entre VEF₁ e CVF (capacidade vital forçada). O critério definido de obstrução ao fluxo aéreo é a relação VEF₁/CVF <70% do seu valor previsto (tabela 1) em associação com um VEF₁ abaixo de 80% do previsto (87,88).

Exacerbações Infeciosas

A exacerbação aguda da DPOC é um evento na história natural da doença caracterizado por uma alteração dos sintomas basais de dispnéia, tosse e/ou expectoração com sintomas mais acentuados que os apresentados usualmente. O quadro pode ser agudo seu início e que pode requerer tratamento adicional (87,89). Este quadro está associado a um maior risco de infecção, pior qualidade de vida, maior custo ao tratamento e maior mortalidade.

O diagnóstico da exacerbação aguda da DPOC é controverso. Usualmente, os pacientes apresentam grande acúmulo de secreções nas vias respiratórias, o que favorece a ocorrência de infecções virais e subsequentes infecções bacterianas, que contribuem para a exacerbação da doença. Entre os fatores a serem considerados no diagnóstico de exacerbação aguda da DPOC podemos citar: isolamento de bactérias em secreção respiratória, uso prévio de antibióticos e parâmetros clínicos e fisiológicos que permitam classificar a gravidade da doença (89,90).

Embora as infecções respiratórias sejam o principal fator de risco para exacerbação da DPOC, estas condições usualmente ocorrem após infecção viral ou outras condições associadas, como poluentes industriais, alérgenos, sedativos, embolia pulmonar e insuficiência cardíaca. Desta maneira, a causa da exacerbação é uma condição multifatorial. A frequência de exacerbações é usualmente associada a pacientes com quadro mais agravados da doença, idade mais avançada e número de exacerbações prévias.

A exacerbação aguda da DPOC provoca uma diminuição transitória da função pulmonar, o que pode persistir por vários dias. Esta condição promove aumento de marcadores inflamatórios em secreções respiratórias, sugerindo inflamação persistente e

potencial dano ao parênquima; finalmente, os neutrófilos são atraídos para dentro do lúmen, o que se associa a uma diminuição do VEF₁, com perda de função pulmonar e aumento da mortalidade em 4,5 vezes (89-91).

Os principais patógenos bacterianos relacionados aos quadros de exacerbação incluem: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre as principais medidas de prevenção das exacerbações da DPOC incluem vacinação (influenzae e pneumocócica) e manutenção crônica da farmacoterapia (bronco-dilatadores, corticosteróides, oxigenoterapia) (89).

Hurst *et al.* (91) avaliaram ao longo de três anos 2138 pacientes com DPOC para aos quais foram prescritos antibióticos ou corticosteróides (ou ambos) ou foram hospitalizados (exacerbação severa). As taxas de exacerbações no primeiro ano foram de 0,85 por pessoa para pacientes com estagio GOLD II; 1,34 para estagio III e 2,0 em estagio IV. Em geral, 22% dos pacientes com doença em estagio II, 33% em estagio III e 47% em estagio IV tiveram exacerbações freqüentes (duas ou mais exacerbações no primeiro ano de seguimento). Os autores concluíram que, embora as exacerbações se tornem mais frequentes e mais graves com a evolução da doença, a taxa de ocorrência parece refletir um fenótipo independente de suscetibilidade, com implicações no direcionamento e estratégias de prevenção nas diferentes fases da doença (91).

Um paciente com DPOC, o uso de corticosteróides, necessidade de ventilação mecânica e ocorrência de infiltrado pulmonar recente preenche critérios de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM), o que pode causada por bactérias, fungos ou mesmo um quadro de hiperhidratação. O melhor entendimento destas comorbidades, assim

como maior investimento nos métodos de diagnóstico e acompanhamento do tratamento, é necessário.

Iniciativa Global para a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (GOLD)

A avaliação da obstrução das vias aéreas tem um papel importante no diagnóstico e estadiamento da DPOC (87,88), conforme as diretrizes global para DPOC.

Classificação da DPOC conforme a gravidade da doença (tabela 2)

A gravidade da doença pode ser observada através da classificação do critérios espirométricos conforme a Tabela 1.

Nos diferentes estágio de classificação podem ocorrer uma variação de sintomas desde quadros de tosse crônica e produção de expectoração, com falta de ar tipicamente desenvolvida ao esforço ate insuficiência respiratória crônica onde a qualidade de vida do paciente está bastante debilitada e as exacerbações podem ser uma ameaça à vida (87-88).

Tabela 1. Critérios espirométricos para estadiamento da DPOC conforme o GOLD.

Estágio I (DPOC leve)	$VEF_1/CVF < 70\%$ $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto
Estágio II (DPOC moderado)	$VEF_1/CVF < 70\%$, $50 \leq VEF_1 < 80\%$ do previsto
Estágio III (DPOC grave)	$VEF_1/CVF < 70\%$, $30 \leq VEF_1 < 50\%$ do previsto
Estágio IV (DPOC muito grave)	$VEF_1/CVF < 70\%$, $30 \leq VEF_1 < 50\%$ do previsto, mais insuficiência respiratória crônica

Legenda: CVF, capacidade vital forçada; VEF_1 , volume expiratório forçado no primeiro segundo.

EPIDEMIOLOGIA DA ASPERGIOSE INVASIVA EM PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

Diversos estudos têm documentado que pacientes com DPOC constituem uma população emergente de risco para AI, especialmente pacientes em uso de corticosteróides (10,49,65,74-76,81,93). A incidência de AI em DPOC tem apresentado grandes variações entre os estudos, o que pode se justificar por variações na incidência da doença entre diferentes centros, dificuldades em se comprovar o diagnóstico de AI (pois biópsias usualmente não são obtidas para estudo histopatológico e cultural), baixa frequência com que se realizam exames de necropsia e pouca suspeição clínica (10). Frequentemente neste grupo é difícil distinguir colonização de infecção, especialmente em uma fase inicial da doença.

Lin *et al.* em uma meta-análise com 50 estudos de AI mostraram que entre 1941 pacientes com AI, 26 (1,3%) tinham DPOC (65). Em uma série de 694 necropsias realizadas em hospital terciário alemão entre os anos de 1993 e 1996, Vogeser e cols. encontraram 27 casos de AI (3,9%). Destes, apenas um paciente foi identificado como tendo DPOC (3,7% dos casos de AI), estando em ventilação mecânica (94). Em estudo conduzido ao longo de 7 anos em UTI belga, Vandewoude e cols. avaliaram retrospectivamente o significado do isolamento de *Aspergillus* em cultivo. Dos 172 pacientes incluídos no estudo, 83 (48,3%) foram classificados (com bases clínicas, de exames de imagem e fatores de risco) como tendo AI (dos quais 17 eram casos provados). Um total de 29 pacientes com DPOC foram também diagnosticados com AI (4 casos provados), dos quais 21 estavam sob corticoterapia sistêmica (3 casos provados). Em adição, 25 pacientes com DPOC no estudo foram considerados colonizados por *Aspergillus*. Uma vez que os autores definiram de modo arbitrário os critérios clínicos e

radiológicos que separavam colonização de infecção (“aspergilose provável”), permanece difícil a interpretação do achado de *Aspergillus* isolados em cultivo de pacientes com DPOC (82).

Em recente revisão da literatura, Ader (49) observou que os estudos avaliando a incidência AI em DPOC têm utilizado diferentes abordagens quanto ao tema. Um modo de analisar o problema seria estudar pacientes com exacerbação aguda de DPOC, quanto à presença de AI, conforme estudo de Gao e cols., onde 5/261 pacientes (1,9%) foram classificados como tendo AI provável/provada (75).

Uma segunda abordagem seria partir dos cultivos positivos para *Aspergillus* em pacientes com DPOC e tentar diferenciar pacientes colonizados de infectados, como realizado por Vandewoude e cols., no estudo já descrito (82). Garnacho-Montero e cols. avaliaram 1756 pacientes em estudo prospectivo multicêntrico conduzido ao longo de 9 meses em 73 UTIs, tendo encontrado AI em 1,1% dos pacientes (81). Em estudo retrospectivo conduzido ao longo de 7 anos por Guinea e cols. na Espanha, *Aspergillus* sp. foi isolado em 239 pacientes com DPOC. Destes, 53 (22,1%) foram classificados como tendo AI provável, sendo que em nenhum caso o diagnóstico de AI foi provado (76). Um dos problemas associados a esta abordagem reside na necessidade de cultivo positivo para *Aspergillus*, o que frequentemente não é obtido na prática clínica.

Ainda referente às observações de Ader (49), uma terceira abordagem consistiria em estudar a incidência de AI em pacientes com DPOC internados em UTI (10,73,74,81,82). Esta foi a abordagem utilizada pelo grupo de Meersseman e cols. (73), em estudo retrospectivo conduzido ao longo de 3 anos e que encontrou AI provável/provada em 105/1850 admissões na UTI (incidência 5,7%). Entre os pacientes com AI, 98,1% estavam em ventilação mecânica (n=103), 31,4% tinham DPOC (n=33) e apenas 17,1% (n=18) eram neutropênicos. A frequência de autópsias no estudo foi de 70%. Em um estudo mais

recente do mesmo grupo (80), onde a frequência de autopsias foi 95%, os autores encontraram evidência de AI provada em 24% dos pacientes na UTI. Curiosamente, os dados que apontam maior frequência de AI na UTI em toda a literatura são oriundos deste grupo, o que nos permite inferir que: (i) estudos nos quais autopsias são realizadas com maior liberdade tendem a demonstrar maior incidência de AI nestes pacientes; (ii) alternativamente, a frequência elevada de AI em UTIs se restringe a determinadas áreas geográficas.

FATOR DE RISCO PARA ASPERGILOSE INVASIVA EM DPOC

Conforme já referido, as diferentes formas clínicas de aspergilose se iniciam fundamentalmente pela presença de conídios de *Aspergillus* sp. nas vias aéreas; posteriormente, de acordo com o grau de imunidade do paciente, pode ocorrer quebra da barreira epitelial pelas hifas, com consequente invasão tecidual e disseminação.

Devido fundamentalmente à falta de estudos delineados para este fim, não se conhece o motivo pelo qual alguns pacientes com DPOC desenvolvem AI. No entanto, os dados disponíveis permitem inferir as principais condições associadas (10,76,92). À semelhança do observado em casos de candidemia, os fatores de risco para AI parecem derivar de dois fatores principais, relacionados a quebra de barreiras de proteção ou imunossupressão. Em pacientes com DPOC, a atividade ciliar é muitas vezes prejudicada pela agressão provocada pelo tabagismo, que pode também provocar dano epitelial, facilitando a adesão dos conídios nas vias aéreas (9,10). Desta forma, pacientes com DPOC parecem ser particularmente propensos à colonização por *Aspergillus* spp.

Pacientes com DPOC são também comumente usuários de corticosteróides, um conhecido fator de risco para o desenvolvimento de AI. Estas drogas podem elevar o risco de aspergilose através de diversas interações com o sistema imune, incluindo efeito deletério em linfócitos (linfopenia, diminuição na produção de linfocinas e desregulação Th1/Th2), neutrófilos (defeito na quimiotaxia, fagocitose, degranulação, produção de óxido nítrico e aderência) e células mononucleares (monocitopenia, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuição da quimiotaxia, retardo na fagocitose e piora da capacidade das células dendríticas em apresentar antígenos) (43). Ainda, o dano mediado por neutrófilos a hifas de *Aspergillus* é reduzido experimentalmente após exposição a dexametasona (96). Estudos *in vitro* têm também demonstrado que a suplementação do

meio de cultivo com corticosteróides favorece o crescimento de isolados de *Aspergillus* (100). Tanto em transplantados de órgãos sólidos como em TCTH, o risco de AI tem se associado com a dose de corticosteróides empregada (25,101,96), tornando este o segundo mais importante fator de risco para a ocorrência de AI, superado apenas por neutropenia prolongada.

A importância dos corticosteróides como fator de risco para AI pode ser bem exemplificada na revisão dos critérios do EORTC/MSG para a definição de infecção fúngica invasiva. Enquanto nas definições de 2002 (37) os autores definiram que o risco para infecção fúngica se associava com uso prolongado (>3 semanas) de corticosteróides nos últimos 60 dias, os critérios revisados de 2008 (38) passaram a incluir um maior detalhamento, definindo dose mínima de 0,3 mg/kg de equivalente de prednisona, por período >3 semanas. Apesar destas mudanças, é preciso salientar que a dose mínima de corticosteróides associada com risco de AI segue pouco definida. Em pacientes usando corticosteróides, doses equivalentes de prednisona de 20 mg/dia ou doses acululadas de >700 mg são associadas a maior risco de doenças infecciosas, incluindo AI (10,75,76). Em relatos esparsos pela literatura, corticoterapia inalatória tem também sido associada com a ocorrência de AI (97,101). Nas principais séries de AI em pacientes com DPOC, a maioria dos pacientes se encontrava em tratamento com corticosteróides. No estudo de Bulpa e cols, que incluiu 56 pacientes com DPOC, 77% (n=43) estavam em uso de corticosteróides, sendo que 3 pacientes apenas faziam uso de medicação por via inalatória (10). Quatro dos cinco pacientes com AI incluídos no estudo de Gao e cols., que avaliou indivíduos com exacerbação de DPOC, estavam sob corticoterapia sistêmica ou inalatória; 3 destes pacientes haviam recebido doses cumulativas >700 mg de equivalentes de prednisona nos últimos 3 meses (75). Na série de Guinea e cols., 49 (92,4%) dos pacientes com AI e 105 (56,4%) dos controles com DPOC sem AI estavam em uso de corticosteróides (76). Doses

>700 mg de prednisona ou equivalente foram usadas por 41 (77,3%) e 46 (24,7%) dos pacientes com e sem AI, respectivamente ($p < 0,001$).

Pacientes com DPOC são também comumente tratados com longos cursos de terapia antimicrobiana. Guinea e cols. demonstraram que o uso de antibióticos nos 3 meses antes da admissão caracterizou-se como fator independente para risco de AI, em pacientes com DPOC (*Odds ratio* 2,57; intervalo de confiança 95% de 1,20-5,50) (76). Os mecanismos relacionados a tal associação foram ainda pouco explorados, sendo possível que antibioticoterapia facilite a colonização da via aérea por *Aspergillus* spp., em um ambiente menos competitivo pela morte bacteriana.

A gravidade da doença pulmonar em pacientes com DPOC, como determinada pelo escore de GOLD, parece também ser importante fator de risco para AI nestes pacientes. O risco parece ser particularmente elevado para pacientes em estágios GOLD III e IV da doença. No estudo de Guinea e cols., todos os pacientes com DPOC diagnosticados com AI estavam em estágio III/IV de GOLD, em comparação com 65,0% dos pacientes com DPOC sem AI ($p < 0,001$) (76). Neste mesmo estudo, admissão em UTI foi identificada como preditor independente de AI (*Odds ratio* 2,41; intervalo de confiança 95% de 1,10-5,29). Todos os cinco pacientes com DPOC e AI incluídos no estudo de Gao e cols. estavam também nos estágio III/IV de GOLD (75). Desta forma, em pacientes com DPOC, AI parece ser uma complicação quase que restrita a pacientes com formas graves de doença pulmonar.

DIFICULDADES DIAGNÓSTICAS DE AI EM DPOC

Embora uma detecção precoce possa reduzir a mortalidade associada à AI (102-104), estabelecer um diagnóstico definitivo é difícil, por várias razões; entre elas, a baixa sensibilidade dos métodos clássicos, a negatividade dos hemocultivos e a dificuldade de realização de procedimentos invasivos (105). Conforme Bulpa e cols., a alta mortalidade da AI pode estar associada ao atraso no diagnóstico, o que requer a combinação de fatores clínicos, achados radiológicos, microbiológicos e de sorologia. Neste estudo, o atraso entre o início dos sintomas clínicos e o diagnóstico foi de 8,5 dias (10).

ASPECTOS CLÍNICOS

Os sintomas clínicos de AI em DPOC são inespecíficos, como a maioria das DFI, representados por pneumonia não responsiva ao uso de antibióticos de amplo espectro, dispnéia exacerbada (32-48%), febre (39%), tosse (26%), sibilância (8-28%) e hemoptise (12-15%) (9,10,95). Outros achados incluem aumento da expectoração e dor torácica (10,95). Cabe salientar que o isolamento de *Aspergillus* em amostra respiratória pode estar relacionado a colonização podendo a alta mortalidade estar relacionada a gravidade da doença de base ou outros fatores do hospedeiro (76).

EXAMES RADIOLÓGICOS

Para a ocorrência de AI é necessário essencialmente uma deficiência no estado imunológico do paciente, exposição aos conídios de *Aspergillus* e colonização. No paciente com DPOC, estes fatores diferem do paciente com doença hematológica e os sinais são menos específicos (febre, aumento de secreção, dispnéia, broncoespasmo) (49). Os exames de imagem mostram um infiltrado bilateral em 54,7% dos casos (76). A AI no paciente neutropênico apresenta necrose, angioinvasão, hemorragia intra-alveolar e infarto pulmonar, enquanto que no paciente não-neutropênico apresenta uma resposta inflamatória sem invasão vascular, hemorragia e infarto (95,106). No paciente com DPOC, o radiograma de tórax pode ser normal, especialmente nos estágios iniciais da AI ou apresentar infiltrados pulmonares (44,7%), consolidação (12,9%), nódulos (10,4%), cavitação (4,6%) e outros achados pouco específicos (76, 90, 95).

Muitos estudos têm demonstrado que a TC pode detectar comprometimento pulmonar em um estágio muito precoce da infecção (107-109). Em particular, o “sinal do halo” (halo de necrose envolvendo o nódulo pulmonar) é considerado um indicador bastante sensível e precoce, enquanto o sinal do ar crescente (resultante de infarto pulmonar delimitado por um espaço com ar), também sugestivo de AI, costuma ser sinal tardio (48). Em pacientes com DPOC, estes sinais têm baixa sensibilidade (5-24%) (49, 80,82), especialmente devido à inexistência de angioinvasão, que é um achado típico do paciente neutropênico. O sinal do halo foi incluído como um dos componentes do critério “clínico” do EORTC para o diagnóstico de AI (37,38). Embora não patognomônico, a alta especificidade do sinal do halo justifica o início do tratamento antifúngico, o que pode melhorar o desfecho dos pacientes com AI (95,103). Recente estudo confirmou a utilidade da TC para a detecção precoce de AI em pacientes severamente imunocomprometidos (109). Entretanto, deve ser

reconhecido que a utilidade deste sinal tem sido avaliada apenas em pacientes neutropênicos. Em outros grupos, incluindo pacientes de UTI, achados de TC são frequentemente ausentes e, quando presentes, são menos específicos (73,82). Muitos pacientes de UTI possuem anormalidades radiológicas devidas a outras causas, como atelectasias ou síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (80).

Em estudo com 53 pacientes com DPOC e AI, Guinea e cols. mostraram que 66% dos 53 pacientes apresentaram agravamento do quadro radiológico durante a internação, o que reforça que o aparecimento de lesões infiltrativas sem resposta ao uso de antimicrobianos deve ser considerado como possível infecção fúngica, especialmente AI (76). A TC pode também ser útil no diagnóstico de doenças não infecciosas como linfomas, neoplasias ou tromboembolismo pulmonar (95). O exame de imagem mostrou 107 pacientes (44,7%) com infiltrado pulmonar, 31 com consolidações (12,9%), 24 com nódulos (10,4%), e 11 com cavitações (4,6%), além de outros achados inespecíficos.

EXAME MICOLÓGICO DIRETO E CULTIVO

O cultivo de secreções respiratórias possui sensibilidade diagnóstica muito baixa. *Aspergillus* é recuperado em cultivo de escarro e de lavado broncoalveolar (LBA) em apenas 8-34% e 45-62% dos pacientes com AI, respectivamente (96). A sensibilidade pode ser ainda mais baixa quando o paciente estiver sob uso de antifúngicos contra fungos filamentosos. Entretanto, a pesquisa direta seja mais frequentemente positiva no paciente infectado em relação ao paciente colonizado e frente a um cultivo puro e repetido em paciente com febre sem resposta ao uso de antibióticos e utilizando corticosteróides, o diagnóstico de AI deve ser considerado. Embora a recuperação de *Aspergillus* spp. do trato respiratório usualmente represente colonização em pacientes imunocompetentes, este achado pode ser altamente sugestivo de DFI em hospedeiro imunocomprometido (110,111). A confirmação diagnóstica usualmente requer avaliação histopatológica; no entanto, quadros de neutropenia ou trombocitopenia marcadas comumente impedem a realização de procedimentos cirúrgicos invasivos nestes pacientes. Biópsias transbrônquicas e escovados brônquicos são associados a uma frequência inaceitável de resultados falso-negativos. Culturas de sangue, líquido cefalorraquidiano ou medula óssea raramente são positivas para *Aspergillus* spp (112).

TESTES SOROLÓGICOS

Pesquisa do antígeno galactomanana

Galactomanana é um polissacarídeo termo-estável liberado durante o crescimento das hifas nos tecidos do hospedeiro (113). Com base na cinética da infecção fúngica *in vivo*, somente quantidades muito limitadas (nanogramas) de antígeno GM entram na corrente sanguínea vindos do sítio pulmonar da infecção (114). A GM é um marcador de disseminação hematogênica do fungo, podendo ser utilizado para início da terapia antifúngica de modo pré-emptivo. O teste é comumente empregado para monitorar pacientes sob risco elevado de AI, testando-se o soro duas a três vezes por semana e observando-se eventuais elevações nos títulos de GM. Apesar da grande variabilidade entre os estudos, a sensibilidade e a especificidade ficam em torno de 71% e 89% respectivamente, com um valor preditivo positivo entre 25-62% e valor preditivo negativo entre 92-98% (63,115-117). Um teste disponível comercialmente é o Platelia™ *Aspergillus* (BioRad, França), que detecta GM por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se anticorpo EB-A2 monoclonal de ratos. O teste é validado para soro com um limite de detecção de aproximadamente 1 ng/ml, o que é 10-15 vezes menor do que o limite de detecção quando utilizada a aglutinação em látex, teste utilizado anteriormente ao ELISA para detecção de galactomanana (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur) (113,118-120). A utilidade do GM para o diagnóstico de AI está bem demonstrada em pacientes neutropênicos (113). Em pacientes não-neutropênicos, é possível que haja reduzida sensibilidade do método. De acordo com as atuais definições do EORTC/MSG, um teste positivo para GM permite classificar um paciente de risco para AI como tendo “aspergilose provável”, à semelhança do que seria possível ao se isolar *Aspergillus* sp. de amostra clínica deste doente (38). Hope *et al.* (121) usaram um modelo *in vitro* de alvéolo pulmonar para

investigar a relação entre galactomanana e AI. Neste estudo, foi observado uma estreita relação temporal entre a penetração das hifas na camada do endotélio celular e aumento dos níveis de GM, o que ocorreu tão precoce quanto 14-16 h após a inoculação com *Aspergillus*. Além disso, utilizando um modelo animal de AI, os autores demonstraram que a GM foi primeiramente detectada no LBA, para depois ser detectada no compartimento endotelial (121-122).

Alguns fatores interferem no resultado do teste. Resultados falso-positivos podem ocorrer em paciente esta sob uso de antibióticos beta-lactâmicos, especialmente piperacilina-tazobactam, antimicrobianos de origem fúngica (*Penicillium*) que apresentam moléculas de galactofuranose, que reagem com os anticorpos utilizados para realização do teste GM (123-125). No Brasil, Xavier e cols. realizaram estudo com piperacilina-tazobactam de cinco laboratórios diferentes e apenas um mostrou concentração $>0,5$; ao realizar diluições visando simular as concentrações de piperacilina-tazobactam atingíveis no plasma, no entanto, os autores não encontraram resultado positivo no teste da GM (126). Uma vez que a quantidade de GM pode variar conforme o lote de piperacilina-tazobactam (124-126), é recomendado que cada hospital teste o novo lote da droga a ser empregado, quanto à liberação *in vitro* de GM. Visando-se limitar a ocorrência de resultados falso-positivos, é também sugerido que as coletas de soro para testagem de GM sejam feitas anteriormente à infusão do antibiótico, quando os níveis destes se encontrarem no limite inferior. Resultados falso-positivos no teste da GM têm também sido associados ao uso de gluconato de sódio (Plasma-lyte®, Baxter, Lessen, Bélgica) (128-129), o qual é produzido pela fermentação de glicose em culturas de fungos, incluindo *Aspergillus* e *Penicillium* spp. Pressupõe-se que moléculas de GM devam permanecer nessas soluções mesmo após o acondicionamento, podendo gerar reação com o teste.

Reações cruzadas também podem ocorrer com outros fungos que podem reagir com

anticorpos específicos do teste, incluindo *Penicillium* spp., *Paecilomyces varioti*, *Blastomyces dermatitidis*, *Nigrospora oryzae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichothecium roseu*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. e *Neosartoria* spp. (113). Além desses agentes, resultados falso-positivos podem ocorrer em bacteremia, ingestão de leite (130) e outros alimentos não esterilizados que apresentem *Aspergillus* como contaminante ou em sua composição (vegetais, massas e arroz) (131,132). Pacientes pediátricos podem apresentar falso-positivos devido a reações cruzadas com *Bifidobacterium bifidum*, um colonizador intestinal muito encontrado em crianças, podendo translocar a barreira intestinal imatura (113,133).

As causas de falso-negativo do Platelia® *Aspergillus* costumam estar ligadas ao emprego de diferentes pontos de cortes para determinar positividade no teste e, sobretudo, ao uso prévio de antifúngicos. O uso de terapia antifúngica contra o *Aspergillus* sp. provoca queda nas quantidades de GM circulante, diminuindo a sensibilidade do teste (113,134). O armazenamento prolongado da amostra (i.e., por meses) pode gerar resultados negativos em até 20% dos casos, conforme observado por Pereira e colaboradores (135).

Visando incrementar a sensibilidade do teste da GM no diagnóstico de AI, têm-se empregado, de modo crescente, a testagem de GM em amostras do trato respiratório, especialmente LBA em pacientes não-neutropênicos. Em estudo retrospectivo observacional em pacientes internados em UTI, somente 53% de pacientes com AI tiveram teste de GM positivo no soro (73). Estudos conduzidos em transplantados de pulmão ou de outros órgãos sólidos reforçam a tese de que a testagem de GM no LBA incrementa a sensibilidade diagnóstica do teste, em comparação com soro (72,121). Nguyen *et al.* (116) avaliaram retrospectivamente o desempenho do teste da galactomanana no LBA de pacientes não-imunocomprometidos. Os seis pacientes com diagnóstico de AI incluídos no estudo demonstraram níveis de galactomanana no LBA $\geq 1,18$ (variando entre 1,18 a 8,89).

Utilizando um ponto de corte de 1,0, a especificidade do teste foi de 88,1% (reduzida para 77,6% quando o ponto de corte foi modificado para 0,5). A dosagem de GM no LBA mostrou-se muito mais sensível do que no soro, com especificidade semelhante. Entretanto, o teste apresentou um valor preditivo positivo de somente 43%, o qual foi atribuído à baixa frequência de AI nos pacientes incluídos no estudo. Em adição, a dosagem de galactomanana em LBA não foi mais sensível do que a combinação de cultivo com microscopia, exibindo um valor preditivo positivo menor do que estes últimos.

Meersseman *et al.* (80) publicaram estudo avaliando o desempenho do teste da GM no LBA no diagnóstico de AI na UTI, utilizando um ponto de corte de 0,5, a sensibilidade e a especificidade no LBA foram de 88% e 87%, respectivamente, enquanto a sensibilidade no soro foi somente 42%.

Um importante limitante à testagem de GM em amostras do trato respiratório diz respeito ao ponto de corte a ser utilizado para determinar positividade. Uma vez que o antígeno é liberado com maior intensidade e precocidade no compartimento alveolar, em comparação com o vascular (121), o uso do mesmo ponto de corte utilizado para soro provavelmente resultará em reduzida especificidade. Em estudo com transplantados de pulmão, o aumento do ponto de corte sugerido para GM foi de 1,5, o que se associou a uma especificidade de 90,4%, em comparação com 40,4% para o ponto de corte 0,5 (72). Por fim, não existe ainda padronização quanto ao volume de fluido a ser instilado na via aérea de pacientes submetidos à testagem de GM no LBA, não havendo também padronização da técnica laboratorial a ser empregada.

Pesquisa de anticorpos

A presença de anticorpos IgG de *Aspergillus* no soro tem sido utilizada no diagnóstico (especialmente quando títulos maiores que 1:2) nas formas crônicas de aspergilose, especialmente bola fúngica, situação onde 80-100% dos pacientes apresentam positividade para anticorpos de *Aspergillus*. Já em pacientes com AI, a sensibilidade dos métodos diagnósticos baseados na detecção de anticorpos costuma ser baixa (136), embora poucos estudos tenham avaliado esta questão. Presumivelmente, pacientes com graus menos acentuados de imunossupressão que venham a desenvolver AI poderiam demonstrar produção de anticorpos, o que talvez seja o caso de pacientes com DPOC que desenvolvam curso subagudo de AI. Até o presente momento, a utilidade destes testes diagnósticos não foi ainda avaliada neste contexto.

BIOLOGIA MOLECULAR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é baseada no mecanismo natural de duplicação do material genético, que ocorre sempre que uma célula se divide para formar duas novas. Primeiramente é necessário que as duas fitas de DNA sejam separadas (desnaturação) através da elevação da temperatura (em torno de 94°C) resultando em duas fitas simples complementares de DNA, formadas por milhares de bases. Após, adicionam-se iniciadores de reação (*primers*), que são pequenos fragmentos de DNA possuindo de 20-30 bases e que se ligam em determinados sítios da cadeia (anelamento), a uma temperatura entre 40-60°C, iniciando novamente a formação de uma fita dupla, sempre no sentido 5'-3'. Finalmente, a uma temperatura em torno de 72°C, ocorre a formação de duplas hélices (extensão), através da enzima DNA polimerase. Após cada ciclo, o número de fragmentos se multiplica de modo exponencial; sendo assim, após uma hora, podem ser produzidos bilhões de cópias de DNA-alvo (137,138).

Muitos autores têm relatado a excelente sensibilidade do PCR no diagnóstico de AI (139-142). Os alvos para a amplificação incluem o DNA mitocondrial, o gene 18S no RNA ribossomal (rRNA) e a região ITS (*internally transcribed spacer*) do rRNA (143). A sensibilidade destes ensaios varia entre 2-20 pg para detecção do DNA do *Aspergillus* em LBA (56) e 10-100 fg em amostras de sangue (1-10 cópias genômicas) (144,145). Entretanto, grande parte das publicações utiliza métodos de PCR *in house*, sendo os resultados muito variados e, por vezes, inconsistentes. Desta forma, PCR não está ainda incluído nos critérios de diagnóstico propostos pelo EORTC/MSG para doenças fúngicas invasivas (105,138). A principal razão para a não aceitação é a ausência de uma técnica de consenso, sendo a sensibilidade e a especificidade do PCR muito dependentes de variáveis como o método de extração do DNA, métodos de amplificação e escolha dos alvos a serem

amplificados, *primers* e enzima *Taq* polimerase (138,145,146). A ausência de uma padronização da extração do DNA fúngico, com diferentes plataformas, alvos e número de ciclos, somado à fragilidade nos critérios de diagnóstico onde usualmente estão agrupados casos de infecção provável junto com provada, acarretam uma grande variação na sensibilidade e especificidade dos diferentes estudos (147,148). Estes fatos tendem a melhorar com o uso de testes comerciais, o que facilita bastante o desenvolvimento de protocolos e padronizações que proporcionem estudos clínicos comparáveis, com maior confiança e segurança para os pacientes.

Em meta-análise (148) avaliando os métodos de PCR *nested* e convencional, a sensibilidade média do uso de LBA para diagnóstico de AI foi de 79% e especificidade de 94%, tendo sido poucos os casos de AI comprovados incluídos no estudo. O autor demonstrou haver grande variabilidade na sensibilidade entre os estudos na área, o que, conforme já mencionado, pode estar relacionado a variações metodológicas entre os mesmos.

Em comparação com métodos convencionais de PCR, o teste de PCR em tempo real permite a detecção rápida do produto (1-2 h); devido ao emprego de sondas que emitem fluorescência, não é necessário abrir o tubo para conferência no gel de eletroforese, o que confere a todo o processo um menor risco de contaminação. Para este fim, pode ser utilizado um corante intercalante fluorescente (*Syber Green*), que se liga de modo inespecífico ao DNA dupla hélice sendo amplificado. Para aumentar a especificidade das reações, é possível se empregar sondas do tipo *Taqman* ou *molecular beacons*. Embora de maior custo, estes métodos conferem maior segurança diagnóstica, uma vez que fluorescem apenas na presença do alvo de interesse. Para reações empregando estas sondas, o diagnóstico costuma ser feito pela visualização gráfica do acúmulo exponencial da emissão de fluorescência, determinando-se o ciclo em que a mesma ocorre; este ponto é denominado

de *Cycle Threshold* (Ct), e define a quantidade de ciclos requeridos na reação para transpor a fluorescência basal. O Ct está relacionado à quantidade de DNA amplificado; assim, quanto maior o Ct, menor é a quantidade de DNA-alvo na amostra inicial. Visando garantir que resultados negativos de PCR não resultem da presença de inibidores da reação de PCR carregados durante o processo de extração do material nucléico, é importante que os testes possuem controles internos de amplificação, usualmente direcionados a genes constitucionais humanos. Resultados negativos na ausência de amplificação do controle interno implicam teste inválido, devido à potencial presença de inibidores da reação de PCR.

Uma vez que os testes de PCR são sabidamente mais sensíveis que o exame micológico direto e cultura (149), o grande desafio em pacientes que apresentam teste positivo de PCR consiste em diferenciar colonização por *Aspergillus* de aspergilose, em suas diferentes formas clínicas. Apesar de existir trabalhos na literatura utilizando PCR em tempo real em pacientes com aspergilose, o melhor uso dos testes moleculares não foi ainda determinado de modo prospectivo em pacientes com DPOC, em particular em combinação com outros testes diagnósticos como GM, IgE, sorologia para *Aspergillus* e exame direto / cultivo (150).

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PROPOSTOS

Na tentativa de padronizar o diagnóstico das infecções fúngicas invasivas, o EORTC e o *National Institute of Allergy and Infectious Diseases / Mycoses Study Group* (NIAID/MSG) estabeleceram, em 2002 (37), critérios diagnósticos específicos para diversas micoses sistêmicas. As infecções fúngicas foram classificadas em três categorias, baseadas em níveis de certeza do diagnóstico: infecção fúngica invasiva comprovada, provável ou possível. Essa classificação depende de critérios do hospedeiro, critérios clínicos e resultados de exames micológicos. Esses critérios foram revisados e atualizados em 2008 (38) e definições são aplicáveis para pacientes hematológicos, com câncer ou com DECH. Embora concebidos para uso em estudos clínicos, estas definições são amplamente utilizadas também na prática clínica. No entanto, estes critérios são pouco aplicáveis à população de pacientes com DPOC; para estes, o critério mais utilizado é o de Bulpa e colaboradores (10), resumidos na tabela 3.

Tabela 2. Critérios propostos por Bulpa e colaboradores (10) para o diagnóstico de aspergilose invasiva em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica.

Definição	Critérios
Doença Provable	Histologia/citologia de lesão pulmonar recente (menos de 3 meses) com hifas e lesão tecidual com um dos seguintes critérios: <ol style="list-style-type: none"> 1. Cultivo de <i>Aspergillus</i> spp em amostra de trato respiratório 2. Sorologia positiva de Ag/Ac para <i>Aspergillus fumigatus</i> 3. Confirmação de que as hifas observadas são de <i>Aspergillus</i> spp.
Doença Provável	Paciente DPOC grave (GOLD III ou IV), uso de corticóides, aumento da dispnéia, exame de imagem recente (menos de 3 meses) compatível e um dos seguintes critérios: <ol style="list-style-type: none"> 1. Cultivo de <i>Aspergillus</i> spp em amostra de trato respiratório 2. Sorologia positiva de anticorpo para <i>Aspergillus fumigatus</i> 3. Confirmação de que as hifas observadas são de <i>Aspergillus</i> spp. 4. Dois testes de antígeno (GM) positivos
Doença Possível	Paciente DPOC grave (GOLD III ou IV), uso de corticóides, aumento da dispnéia, exame de imagem recente (menos de 3 meses), sem visualização de hifas, cultivo ou sorologia
Colonização	Paciente com DPOC e cultivo de <i>Aspergillus</i> em trato respiratório, sem aumento da dispnéia, broncoespasmo ou novo infiltrado pulmonar

Legenda: Ag/Ac, antígeno / anticorpo; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; GM, galactomanana; GOLD, *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*.

MORTALIDADE

A mortalidade em pacientes com DPOC e AI tem índices bastante elevados (72-95%) (10,74,76,80). A alta mortalidade nestes pacientes é atribuída principalmente ao diagnóstico tardio (média 8,5 dias após o aparecimento dos sintomas), gravidade da doença de base e à baixa sensibilidade dos métodos tradicionais de diagnóstico, como microscopia e cultivo (10). Meerssamann e cols. observaram mortalidade no grupo de pacientes com AI provada foi de 92%, incluindo pacientes com DPOC e 58% sob uso de esteróides; neste estudo, somente 4 dos 26 casos provados foram diagnosticados antes do óbito (80).

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:5-11.
2. Slavin M, Fastenau J, Sukarom I, Mavros P, Crowley S, Gerth WC. Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. *Int J Infect Dis.* 2004;8:111-20.
3. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007;45:321-46.
4. Van Burik JH, Leisenring W, Myerson D, *et al.* The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine (Baltimore).* 1998;77:246-54.
5. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:161-72.
6. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect.* 1996;33:23-32.
7. Yamazaki T, Kume H, Murase S, Yamashita E, Arisawa M. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1732-8.
8. Chandrasekar PH, Alangaden G, Manavathu E. *Aspergillus*: an increasing problem in tertiary care hospitals? *Clin Infect Dis.* 2000;30:984-5.
9. Latgé, JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:310-50.

10. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2007;30:782-800.
11. Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Difference and Similarities Among Pathogenic *Aspergillus* Species. In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 7-32.
12. Gonçalves SS. Caracterização Genotípica e fenotípica de Isolados Clínicos e Ambientais Pertencentes a *Aspergillus* seção *Flavi*. 142f. Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Infectologia. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2011.
13. Johnson EM, Borman AM. The importance of conventional methods: microscopy and culture. In: *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010:55-73
14. Deak E, Balajee SA. Molecular Methods for Identification of *Aspergillus* Species In: *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 75-83.
15. Denning D. Introduction. In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 3-5.
16. Wingard JR, Hsu J. Clinical manifestations of invasive pulmonary aspergillosis. In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 381-89.
17. Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest* 2009, 135: 805-826.
18. Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med*. 2009;360:1870-84.
19. Lazarus AA, Thilagar B, McKay SA. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Dis Mon*. 2008;54:547-64.

20. Akiyama K. ABPA as an Occupational Disease. In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 689-93.
21. Argawal R, Aggarwal AN, Gupta D, Jindal SK. *Aspergillus* hipersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analyses. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13:936-44.
22. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:707-17.
23. Romani L. Immunology of *Aspergillus* and Aspergillosis: The story so far. In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 33-52.
24. Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am*. 2002 Dec;16:875-94.
25. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002;100:4358-66.
26. Trifilio SM, Bennett CL, Yarnold PR, McKoy JM, Parada J, Mehta J *et al*. Breakthrough zygomycosis after voriconazole administration among patients with hematologic malignancies who receive hematopoietic stem-cell transplants or intensive chemotherapy. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39:425-9.
27. Saegeman V, Maertens J, Meersseman W, Spriet I, Verbeken E, Lagrou K. Increasing incidence of mucormycosis in university hospital, Belgium. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1456-8.
28. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010; 51:561-70.

29. Nucci M, Cunha CA, Silla L, Bittencourt H, Souza CA, Cappellano P, et al. Multicenter Survey of Invasive Fungal Infections (IFI) in Patient with Hematologic Malignancies and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients (HSCT) in Brazil. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2008. Poster M-731.

30. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:599-607.

31. Colombo AL, Nucci M, Park BJ et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006;44:2816-23.

32. Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2005;9:411-8.

33. Aquino VR, Verçosa EB, Falhauber G, Lunardi LW, Silla L, Pasqualotto AC. Distribution of filamentous fungi causing invasive fungal disease at the Haematological Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Braz J Infect Dis. 2010;14:277-80.

34. Carvalho-Dias VM, Sola CB, Cunha CA, Shimakura SE, Pasquini R, Queiroz-Telles F. Invasive aspergillosis in hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective analysis. Braz J Infect Dis. 2008;12:385-9.

35. Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of Invasive Aspergillosis. In: Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 345-79.

36. Paterson DL, Singh N. Invasive aspergillosis in transplant recipients. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78:123-38.
37. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*. 2002;34:7-14.
38. Pauw BD, 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 Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1813-21.
39. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, et al. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Aspergillus Study Group. Medicine (Baltimore)*. 2000;79:250-60.
40. Grossi, P., Farina, C., Fiocchi, R. & Dalla Gasperina, D. Prevalence and outcome of invasive fungal infections in 1,963 thoracic organ transplant recipients: a multicenter retrospective study. *Italian Study Group of Fungal Infections in Thoracic Organ Transplant Recipients. Transplantation*. 2000;70:112-6.
41. Denning, D. W. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998;26:781-803.
42. Agostinho C, Cristina C, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Denning DW, Romani L. Genetic variability of innate immunity impacts human susceptibility to fungal diseases. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e460-8.
43. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet*. 2003;362:1828-38.

44. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2008;359:1766-77.
45. Wingard JR, Hsu J. Clinical Manifestations of Invasive Pulmonary Aspergillosis. In *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 381-390
46. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol.* 1997;15:139-147.
47. Nucci M, Anaissie. Optimising the Use of Non-invasive Tests: From Blood to Radiology. In *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 407-422.
48. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, et al. Increasing Volume and Changing Characteristics of Invasive Pulmonary Aspergillosis on Sequential Thoracic Computed Tomography Scans in Patients With Neutropenia. *J Clin Oncol.* 2001;19:253-259.
49. Ader F. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: an emerging fungal disease. *Curr Infect Dis Rep.* 2010;12:409-16.
50. Cahill BC, Hibbs JR, Savik K, et al. *Aspergillus* airway colonization and invasive disease after lung transplantation. *Chest.* 1997;112:1160-4.
51. Blanco JL, Guedeja-Marron J, Caballero J, Garcia ME. Aspergillosis: Mechanisms of pathogenicity implicated and approach to laboratory diagnosis.. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15:10-5.
52. Maris C, Martin B, Creteur J, et al. Comparison of clinical and post-mortem findings in intensive care unit patients. *Virchows Arch.* 2007;450:329-33.

53. Sales MPU, Severo LC, Geyer GR, Camargo JJP. Fungal infection in single and bilateral lung transplantation: report of 17 cases in 42 consecutive recipients. *S Am J Thorac Surg.* 1998;1:15-7.

54. Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study-Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis.* 2007;45:1161-70.

55. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive mould infections in the setting hematopoietic cell transplantation: current trends and new challenges. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22:376-84.

56. Mcwhinney Ph, Kibbler CC, Hamon MD, Smith OP, Gandhi LB, Berger LA, et al. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years' experience. *Clin Infect Dis.* 1993;17:397-404.

57. Singh N, Paterson DL . *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:44–69.

58. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis.* 2010;50:1091-100.

59. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol;* 2005;43:49-58.

60. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steibach W, Olyaei A, Fishman J et al. Epidemiology and Outcome of Invasive Fungal Infection in Adult Hematopoietic Stem Cell

Transplant Recipients: Analyses of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance Registry. *Clin Infect Dis*. 2009;48:265-73.

61. Panackal AA, Li H, Kontoyiannis DP, Mori M, Perego CA, Boeckh M, Marr KA. Geoclimatic Influences on Invasive Aspergillosis after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2010; 50:1588-1597.

62. Gil L, Kozłowska-Skrzypczak M, Mol A, Poplawski D, Styczynski J, Komarnick M. Increased risk for invasive aspergillosis in patients with lymphoproliferative diseases after autologous hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43:121-6.

63. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347:408-15.

64. Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, Ebrahimi R, Ullmann AJ, Bouza E, et al. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin Infect Dis*. 2007;44:1289-97.

65. Lin S, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature. *Clin Infect Dis*. 2001;32:358-66.

66. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive Aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*. 2007;44:531-40.

67. Gallien S, Fournier S, Porcher R, Bottero J, Ribaud P, Sulhian A, et al. Therapeutic outcome and prognostic factors of invasive aspergillosis in a infectious diseases department: a review of 34 cases. *Infection*. 2008;36:533-8.

68. Nucci M, Gloria AB, Silla L, Cunha CA, Simoes B, Ribeiro MPD, et al. Prospective multicenter surveillance study of invasive fungal diseases in hematopoietic stem cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukemia. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2011. Abstract M-1508.

69. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis*. 2010 Apr 15;50:1101-11.

70. Silveira FP, Husain S. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Solid Organ Transplant Recipients. In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 568-581.

71. Singh, N. & Husain, S. *Aspergillus* infections after lung transplantation: clinical differences in type of transplant and implications for management. *J Heart Lung Transplant*. 2003; 22:258–66.

72. Pasqualotto AC, Xavier MO, Sánchez LB, de Oliveira Costa CD, Schio SM, Camargo SM, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients by detection of galactomannan in the bronchoalveolar lavage fluid. *Transplantation*. 2010; 90: 306-11.

73. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:621-5.

74. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2007;45:205-16.

75. Gao X, Chen L, Hu G, Mei H. Invasive pulmonary aspergillosis in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and the diagnostic value of combined serological tests. *Ann Saudi Med.* 2010 May-Jun;30:193-7.

76. Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, Muñoz P, Pozo F, Peláez T, et al. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Jul;16:870-7.

77. Roosen J, Frans E, Wilmer A, Knockaert DC, Bobbaers H. Comparison of premortem clinical diagnoses in critically ill patients and subsequent autopsy findings. *Mayo Clin Proc* 2000;75:562-7.

78. Esteban A, Fernandez-Segoviano P. Is autopsy dead in the ICU? *Intensive Care Med.* 2003;29:522-5.

79. Dimopoulos G, Piagnerelli M, Berre J, Salmon I, Vincent JL. Post mortem examination in the intensive care unit: still useful? *Intensive Care Med.* 2004;30:2080-5.

80. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177:27-34.

81. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ortiz-Leyba C, León C, Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, et al. Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. *Crit Care.* 2005;9:191-9.

82. Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmermanet W, Colardyn F, Vogelaers D. Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care.* 2006;10:R31.

83. Valles J, Mesalles E, Mariscal D, del Mar Fernández M, Peña R, Jiménez JR, Rello J. A 7-year study of severe hospital-acquired pneumonia requiring ICU admission. *Intensive Care Med.* 2003;29:1981-8.

84. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1589-96.

85. Clancy CJ, Nguyen MH. Acute community-acquired pneumonia due to *Aspergillus* in presumably immunocompetent hosts: clues for recognition of a rare but fatal disease. *Chest*. 1998;114:629-34.

86. Chen KY, Ko SC, Hsueh PR, Luh KT, Yang PC. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. *Chest*. 2001;120:177-84.

87. Silva LCC, Hetzel JL, Felicetti JC, Moreira JS, Camargo JJ, Porto N et al. *Pneumologia; princípios e prática*. Porto Alegre: Artmed, 2012. 1002 p.

88. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD (2010 update) Publications Reviewed by the GOLD Science Committee.

89. Anzueto A, Sethi S, Martinez F. Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 1;4(7):554-64.

90. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA, Agusti A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EF, Wedzicha JA; Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1128-38.

91. Pauwels R, Calverley P, Buist AS, Rennard S, Fukuchi Y, Stahl E, Löfdahl CG. COPD exacerbations: the importance of a standard definition. *Respir Med*. 2004 ;98(2):99-107.

92. Meersseman W. Invasive Aspergillosis in the Intensive Care Unit: Beyond the Typical Haematological Patient In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 486-503.

93. Samarakoon P, Soubani AO. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. *Chron Respir Dis*. 2008;5:19-27.

94. Vogeser M, Haas A, Aust D, Ruckdeschel G. Postmortem analysis of invasive aspergillosis in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997;16:1-6.

95. Valle JM, González-Barcala FJ, Álvarez-Dobaño JM, Valdés LC. La aspergilosis pulmonar invasiva en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica / Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Med Chile*. 2010; 138:612-20.

96. Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients. *Med Mycol*. 2009;47:S271-81.

97. Ng TT, Robson GD, Denning DW. Hydrocortisone-enhanced growth of *Aspergillus* spp.: implications for pathogenesis. *Microbiology* 1994;140:2475-9.

98. Gustafson TL, Schaffner W, Lavelly GB, Stratton CW, Johnson HK, Hutcheson RH Jr. Invasive aspergillosis in renal transplant recipients: correlation with corticosteroid therapy. *J Infect Dis*. 1983;148:230-8.

99. Patterson JE. Epidemiology of fungal infections in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis*. 1999;1:229-36.

100. Peter E, Bakri F, Ball DM, Cheney RT, Segal BH. Invasive pulmonary filamentous fungal infection in a patient receiving inhaled corticosteroid therapy. *Clin Infect Dis*. 2002; 35:54-56.

101. Leav BA, Fanburg B, Hadley S. Invasive pulmonary aspergillosis associated with high-dose inhaled fluticasone. *N Engl J Med*. 2000;343:586.

102. Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1996;23:608-15.
103. Von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, Van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 1995;62:341-7.
104. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol*. 1997;15:139-47.
105. Pasqualotto AC, Denning DW. Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:1060-76.
106. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Roilides E, Kleiner DE, Schauffele R, Roden M, et al. Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:349-55.
107. Hauggaard A, Ellis M, Ekelund L. Early chest radiography and CT in the diagnosis, management and outcome of invasive pulmonary aspergillosis. *Acta Radiol*. 2002;43:292-8.
108. Greene R. The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2005;43:S147-54.
109. Greene RE, Schlamm HT, Stark P, Durand C, Lortholary O, Wingard JR, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis*. 2007;44:373-9.
110. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med*. 1996;100:171-8.
111. Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol*. 1986;86:518-23.
112. Stevens DA, Kan VL, Judson MA, et al. Practice guidelines for diseases caused

by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2000;30:696-709.

113. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. Mycopathologia. 2007;163:191-202.

114. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis. 2004;4:349-57.

115. Pfeiffer, C. D., Fine, J. P. & Safdar, N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2006, 42,1417-27.

116. Nguyen MH, Jaber R, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ, et al. Use of bronchoalveolar lavage to detect galactomannan for diagnosis of pulmonary aspergillosis among nonimmunocompromised hosts. J Clin Microbiol. 2007;45:2787-92.

117. Pasqualotto AC, Denning DW. Diagnosis of invasive fungal infections – current limitations of classical and new diagnostic methods. Business briefing: European Oncology. 2005:1-5.

118. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 1995;33:497-500.

119. Hopwood V, Johnson EM, Cornish JM, Foot AB, Evans EG, Warnock DW. Use of the Pastorex aspergillus antigen latex agglutination test for the diagnosis of invasive aspergillosis. J Clin Pathol. 1995;48:210-3.

120. Verweij PE, Latge JP, Rijs AJ, Melchers WJ, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. J Clin Microbiol. 1995;33:3150-3.

121. Hope WW, Kruhlak MJ, Lyman CA, Petraitiene R, Petraitis V, Francesconi A, et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J Infect Dis.* 2007;195:455-66.

122. Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation.* 2007;83:1330-6.

123. Maertens J, Theunissen K, Lagrou K. Galactomannan Testing. In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention.* Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010:105-124.

124. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele, Kelaher A, et al. Detection of Galactomannan Antigenemia in Patients Receiving Piperacillin-Tazobactam and Correlations between In Vitro, In Vivo, and Clinical Properties of the Drug-Antigen Interaction. *J Clin Microbiol.* 2004, 42:4744-48.

125. Penack O, Rempf P, Graf B, Thiel E, Blau IW. False-positive *Aspergillus* antigen testing due to application of piperacillin/tazobactam - Is it still an issue? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:117-20.

126. Orlopp K, Von Lilienfeld-Toal M, Marklein G, Reiffert SM, Welter A, Hahn-Ast C, et al. False positivity of the *Aspergillus* galactomannan Platelia ELISA because of piperacillin/tazobactam treatment: does it represent a clinical problem? *J Antimicrob Chemother.* 2008 62:1109-12.

127. Xavier MO, Pasqualotto AC, Aquino VR, Sukiennik TC, Severo LC, et al. Galactomannan Detection from Piperacillin-Tazobactam Brands Available in the Brazilian Market. *Braz J Infect Dis.* 2009;13:353-5.

128. Surmont I, Stockman W. Gluconate-Containing Intravenous Solutions: Another Cause of False-Positive Galactomannan Assay Reactivity. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1373.

129. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J. Intravenous plasma-lyte as a major cause of false-positive results of platelia *Aspergillus* test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3141-2.
130. Gangneux JP, Lavarde D, Bretagne S, Guiguen C, Gandemer V. Transient *Aspergillus* antigenaemia: think of milk. *Lancet.* 2002;359:1251.
131. Bouakline A, Lacroix C, Roux N, Gangneux JP, Derouin F. Fungal Contamination of Food in Hematology Units. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4272-3.
132. Ansorg R, van den Boom R, Rath P-M. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses.* 1997, 40:353-57.
133. Siemann M, Koch-Dörfler m, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia® *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses.* 1998, 41:373-77.
134. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal Therapy Decreases Sensitivity of the *Aspergillus* Galactomannan Enzyme Immunoassay. *Clin Infect Dis.* 2005, 40:1762-9.
135. Pereira CN, Del Nero G, Lacaz CS, Machado CM. The contribution of galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Mycopathologia.* 2005, 159:487-93.
136. Barton RC. *Aspergillus* Precipitins and Serology. In: *Aspergillosis: from diagnosis to prevention.* Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010.159-69.
137. Sanguinetti M, Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3922-5.

138. Lewis White P, Barnes AR. Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Tests In Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention. Pasqualotto AC, ed. Springer, NL 2010: 135-57.
139. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2464-8.
140. Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Böhme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis.* 2000;181:1713-9.
141. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Ritter J, Suedhoff T, Baldus M, et al. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clin Infect Dis.* 2001;33:428-35.
142. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1407-122.
143. Ferns RB. Evaluation of the role of real-time PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Leuk Lymphoma.* 2006;47:15-20.
144. Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47:487-96.
145. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2004;139.
146. Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis

and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;45:361-8.

147. Buchheidrtt D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B, Hehlmann R. Current molecular diagnostic approaches to systemic infections with aspergillus species in patients with hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2004;45:463-8.

148. Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Ver Iberoam Micol* 2007, 24, 89–94.

149. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.

150. Denning DW, Park S, Lass-Florl C, Fraczek MG, Kirwan M, Gore R, et al. High-frequency Triazole Resistance Found In Nonculturable *Aspergillus fumigatus* from Lungs of Patients with Chronic Fungal Disease. *Clin Infect Dis* 2011;52:1123-29.

JUSTIFICATIVA

Pacientes com DPOC são considerados como população emergente para a ocorrência de AI, particularmente no contexto de ventilação mecânica e corticoterapia. No entanto, os dados da literatura sobre a incidência de AI nestes pacientes são muito heterogêneos, não existindo estudos prospectivos conduzidos no cenário da América Latina. Ainda, o desempenho de novos testes diagnósticos não-baseados em cultura, como GM e PCR, não foi avaliado de modo sistemático.

OBJETIVOS

Geral

Documentar a incidência de aspergilose invasiva em pacientes com DPOC em ventilação mecânica demonstrando novo infiltrado pulmonar sob corticoterapia.

Específicos

Comparar o desempenho de testes diagnósticos clássicos em micologia com métodos não-baseados em cultura, incluindo GM e PCR em tempo real, no diagnóstico de AI na população acima referida.

Invasive aspergillosis (IA) in ventilated patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a prospective, multicentre study

Valério R. Aquino,^{1,2} Fabiano Nagel,² Huander F. Andreolla,³ Fernanda de Paris,²
Melissa O. Xavier,⁴ Luciano Z. Goldani,^{1,2} David W. Denning,⁵ Alessandro C.
Pasqualotto^{1,3,6}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

³Santa Casa Complexo Hospitalar, Porto Alegre, Brazil;

⁴Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil;

⁵The University of Manchester and Manchester Academic Health Science Centre,
United Kingdom;

⁶Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Author for correspondence:

Alessandro Comarú Pasqualotto

Laboratório de Biologia Molecular, Santa Casa de Porto Alegre

Avenida Independência 155, Hospital Dom Vicente Scherer, heliponto

Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-075

Phone: (+51) 32137490

E-mail: pasqualotto@santacasa.tche.br

INTRODUCTION

Recently, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has been recognized as an emerging predisposing condition to invasive aspergillosis (IA), mostly when associated with mechanical ventilation (MV) and therapy with corticosteroids [1-4]. A high mortality rate has been described in COPD patients with IA [1,2,4-6], which has been associated with a delayed diagnosis [1]. However, few studies have evaluated the performance of non-culture based diagnostic tests in this population [2,6]. Here we determined the frequency of IA in mechanically ventilated COPD patients, and compared classical methods in medical mycology with non-culture based methods, including galactomannan (GM) and real time polymerase chain reaction (PCR) testing.

MATERIALS AND METHODS

Study Design. Prospective multicentre cohort study.

Study Period and Participating Institutions. Patients were enrolled during Jan/09-Dec/10 in three intensive care units (ICUs) in two university hospitals in Porto Alegre, Brazil (total 2,000-beds).

Inclusion Criteria. COPD patients receiving corticosteroids who demonstrated a new lung infiltrate while on MV.

Exclusion Criteria. Chronic pneumonia, recent (<14 days) use of anti-mould drugs, hematological malignancy, neutropenia, and organ transplantation.

Definitions. IA was defined based on the Bulpa criteria [1].

Sample and Assays. Respiratory samples (tracheal aspirates in 45/47) were obtained and processed for microscopy/culture, and GM testing (Platelia™ *Aspergillus* EIA, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France). DNA was extracted from respiratory

samples using MycXtra kit (Myconostica, Manchester, UK) immediately after receipt and stored at -80°C until analysis in batches. Two commercial real-time PCR assays for *Aspergillus* spp. DNA amplification were performed in duplicate: *Aspergillus* spp q-PCR Alert kit (Nanogen, Torino, Italy) in an ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, USA) thermocycler and the MycAssayTM *Aspergillus* kit (Myconostica) on the SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, USA). Serum was obtained and tested for GM, *Aspergillus* precipitins, and total IgE levels.

Patient data. Clinical records were reviewed to document basic demographics, medical illness, smoking history, use of antibiotics, days on MV, microbiological and spirometry results, and length of hospital and ICU stay. Corticosteroid dosages were determined in terms of prednisone equivalents. Severity of lung disease was determined using GOLD stage.

Statistical analyses. Quantitative variables were compared using Mann-Whitney test, and categorical data with chi-square/Fisher's exact test. P values of $\leq 5\%$ were statistically significant.

Ethical aspects. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee in each hospital.

RESULTS

Demographic data. A total of 47 patients were enrolled (female 40.4%). Mean age was 68.6 years (± 9.9). Most patients had severe COPD (GOLD stages III/IV in 72.8%), and 12.8% (n=6) were also diagnosed with asthma. Spirometry tests were obtained for 33 patients – most of these (87.9%) had pure obstructive disease. Steroid dosages ranged from 100-4125 mg (median 900 mg).

Bacteriological results. All patients received antibiotics in the 14 days before

inclusion. Bacteria were recovered from respiratory cultures in 42.6% (n=20), mostly enterobacteria (n=12).

Microscopy/culture. *Aspergillus* section *Fumigati* was recovered from 2 patients (4.2%; 200 CFU/mL each). Additional fungi recovered from two other patients included *Histoplasma capsulatum* and *Scedosporium apiospermum*.

Aspergillus precipitins and IgE levels. Precipitins were positive for 3 patients, at low titers ($\leq 1:2$). Six patients had asthma and IgE levels in these patients varied from 70-704 IU/mL (median 125 IU/mL).

GM results. Most (44/47) serum GM indices were < 0.5 . In respiratory samples, indices of ≥ 0.5 , ≥ 1.0 and ≥ 1.5 were observed in 74.5%, 40.5%, and 21.3%, respectively – no association between serum/respiratory GM and antibiotics including beta-lactams was observed.

PCR results. Nanogen PCR was positive for one patient, who had a GM index in the tracheal aspirate of 4.4 and *A. fumigatus* was recovered in culture. She died soon after the diagnosis of IA was made. Nanogen PCR however was negative for one another patient who was also *Aspergillus* culture-positive, despite amplification of the internal control. This particular patient had a GM respiratory index of 1.2 and a serum IgE of 799 IU/mL – he was discharged without antifungal therapy. Myconostica PCR detected *Aspergillus* DNA in 10 patients, including the two cases that were also culture-positive, with cycle threshold values varying from 33.9-37.8.

Combining GM and PCR results. Neither GM nor PCR results were independently associated with survival. For instance, mortality in the group of patients with GM respiratory indices ≥ 2 was 50.0%, compared to 53.8% in the GM < 2 group. Patients with positive PCR results (Myconostica) for *Aspergillus* had a 60.0% mortality, versus 51.4% for PCR-negative patients (p=0.730). A high GM respiratory index (i.e., > 2.0) in a PCR-

positive patient may however separate patients who are colonized by *Aspergillus* from those who have IA (Figure 1). Among PCR-positive patients, all patients (n=2) demonstrating GM respiratory indices of >2.0 died, in comparison to 50% of patients who were PCR-negative and had GM respiratory indices of >2.0 (3/6).

Antifungal treatment. Only one patient with scedosporiosis received an antifungal agent with anti-mold activity.

Outcome. Overall mortality was 53.2% (25/47). No autopsy was performed. The main findings of this study are summarized in Table 1.

DISCUSSION

Recent studies suggest that IA may be frequent in ICU patients [1-5]. COPD patients seem to be particularly at risk, which has been associated with *Aspergillus* colonization, severity of lung disease, MV and corticosteroids [1,2,5,6]. Based on these observations, we selected for inclusion in the current study patients who were theoretically at high risk for IA. Even though the minimum frequency of probable IA in our study was only 4.2%, most of the other studies in COPD patients showed similar/lower rates of IA. Gao *et al.* [3] studied 261 patients with exacerbated COPD and found that only 1.9% had IA. In the study by Guinea *et al.* [2], 53 cases of IA were found among 14,618 COPD patients requiring hospital admission (incidence 0.4%). On the other extreme, Belgian studies showed IA frequencies as high as 6-24% in ICU patients [5,6], with some of these patients also being diagnosed with COPD (7.7-31.4%). Since the frequency of necropsy in the Belgian studies was very high (70-95%), one might argue that IA is one of the most frequently missed diagnoses in the ICU. However, these were all single ICU-studies so the impact of environmental factors or the possibility of an outbreak cannot be excluded.

An important limitation to the diagnosis of IA in COPD patients is the criteria

currently used to define the disease. According to the Bulpa criteria [1], the growth of *Aspergillus* sp. in any patient with severe COPD who is also taking steroids and who presents with a worsening lung disease will be considered as ‘probable IA’. *Aspergillus* is certainly causing colonization in many of these cases, as demonstrated by one of the patients in our case series. The performance of newer non-culture-based tests in such patients had not yet been systematically evaluated.

Most COPD patients in this study had high GM indices in respiratory samples. However, no particular factor could be associated with a ‘false-positive’ GM result in our study. We were not able to determine a cut-off to separate infected/non-infected patients. As expected, serum GM was also of no utility in this context [2]. One of the potential explanations for the high GM titers in respiratory samples resides on the fact that we tested mostly blind tracheal washings (96%) while in other studies most samples were bronchoalveolar lavage (BAL) fluids. BAL fluid is always diluted, and so GM indices might be expected to be lower. GM has also been detected in sputum, with higher optical indices and reduced specificity in comparison to the BAL fluid [8]. However, it should be noted that no standardized technique has been published for processing respiratory samples, which could impact on GM concentration and sensitivity of microscopy, culture, PCR and GM. Our data throws doubt on a 0.5 GM cut-off for respiratory samples [7]; Meersseman et al found a GM of ≥ 0.5 was highly associated with IA but median indices were ~ 4 and ~ 1.5 for patients with proven and probable IA respectively [6]. This is at variance with the latest FDA approval of GM for respiratory samples in the US with a 0.5 cut-off.

In this study, we showed that PCR was more sensitive than microscopy/culture in determining the presence of *Aspergillus* in the airways. These results were somehow expected, based on previous observations [8]. However, it remains difficult to differentiate

PCR-positive patients into the following groups: (i) allergic disease; (ii) chronic pulmonary aspergillosis (CPA); (iii) tracheobronchitis; (iv) colonization; and (v) invasive pulmonary aspergillosis. The first can be inferred by the presence of asthma, high IgE levels and eosinophilia, which did not occur in our study. CPA should be suspected in patients with lung cavities and chronic symptoms – such individuals were also not included. Tracheobronchitis was not observed since only two patients were submitted to bronchoscopy. The main challenge relies on the differentiation of *Aspergillus* colonization in a critically-ill COPD patient from IA. A high GM index in the respiratory tract in a PCR-positive patient could potentially help in that sense. A cut-off of ≤ 1.2 was definitively not discriminative, while increasing the cut-off to 1.5-2.0 could be helpful, even though numbers were quite small for irrefutable arguments.

This study is the first comparison of two commercial PCR kits for *Aspergillus* spp. When comparing two commercially available *Aspergillus* PCR kits, we found that MycAssay™ *Aspergillus* kit (Myconostica, UK) was more sensitive than *Aspergillus* spp q-PCR Alert kit (Nanogen, Italy), using the same extraction method. The reasons for such differences are not completely immediately apparent. Even though both kits target the same genomic region (18S rDNA), they must vary in their PCR efficiency.

Our study had some limitations that deserve discussion. Despite running the study in three ICUs, patient inclusion was quite slow and we ended up with a limited number of evaluable patients. Many patients were treated in semi-intensive care units and were therefore not enrolled. Most importantly, we were not able to perform autopsy in any patient.

In conclusion, this prospective multicentre study demonstrated a low minimum incidence (4.2%) of IA in COPD patients. The combination of PCR with GM testing in respiratory samples deserves additional investigation, given the known insensitivity of

culture for IA in all clinical settings.

Acknowledgment

We are in debt with our ICU and infection control colleagues, for their help in recruiting patients for this study. This study was sponsored by independent research grants from Pfizer, Biometrix and Myconostica.

Conflict of Interest Statement

Dr Denning holds founder shares in F2G Ltd a University of Manchester spin-out company and has received grant support from F2G as well as the Fungal Research Trust, the Wellcome Trust, the Moulton Trust, The Medical Research Council, The Chronic Granulomatous Disease Research Trust, the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health Research, the European Union and AstraZeneca. He acts as an advisor/consultant to F2G and Myconostica (now part of Lab21 group) as well as other companies over the last 5 years including Pfizer, Schering Plough (now Merck), Nektar, Astellas and Gilead. He has been paid for talks on behalf of Merck, Astellas, Novartis, Merck, Dainippon and Pfizer. In the past 5 years, Dr Pasqualotto has received grant support from Pfizer, Merck, United Medical, Bago, CAPES, CNPq, FAPERGS, The Fungal Research Trust, Sigma-Tau and Myconostica. He has been a speaker to or has received travel grants from Pfizer, Schering-Plough (now Merck), Astellas, United Medical, Biometrix, Merck, and Bagó. All other authors: no conflict of interest to declare.

References

1. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 30:782-800.
2. Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, Muñoz P, Pozo F, Peláez T, de Miguel J, Bouza E. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:870-7.
3. Gao X, Chen L, Hu G, Mei H. Invasive pulmonary aspergillosis in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and the diagnostic value of combined serological tests. *Ann Saudi Med* 2010; 30:193-7.
4. Ader F. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: an emerging fungal disease. *Curr Infect Dis Rep* 2010; 12:409-16.
5. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:621-5.
6. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, Spriet I, Verbeken E, Van Wijngaerden E. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:27-34.
7. Kimura S, Odawara J, Aoki T, Yamakura M, Takeuchi M, Matsue K. Detection of sputum *Aspergillus* galactomannan for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. *Int J Hematol* 2009; 90: 463-70.
8. Denning DW, Park S, Lass-Flörl C, Fraczek MG, Kirwan M, Gore R, Smith J, Bueid A, Moore CB, Bowyer P, Perlin DS. High frequency triazole resistance found in

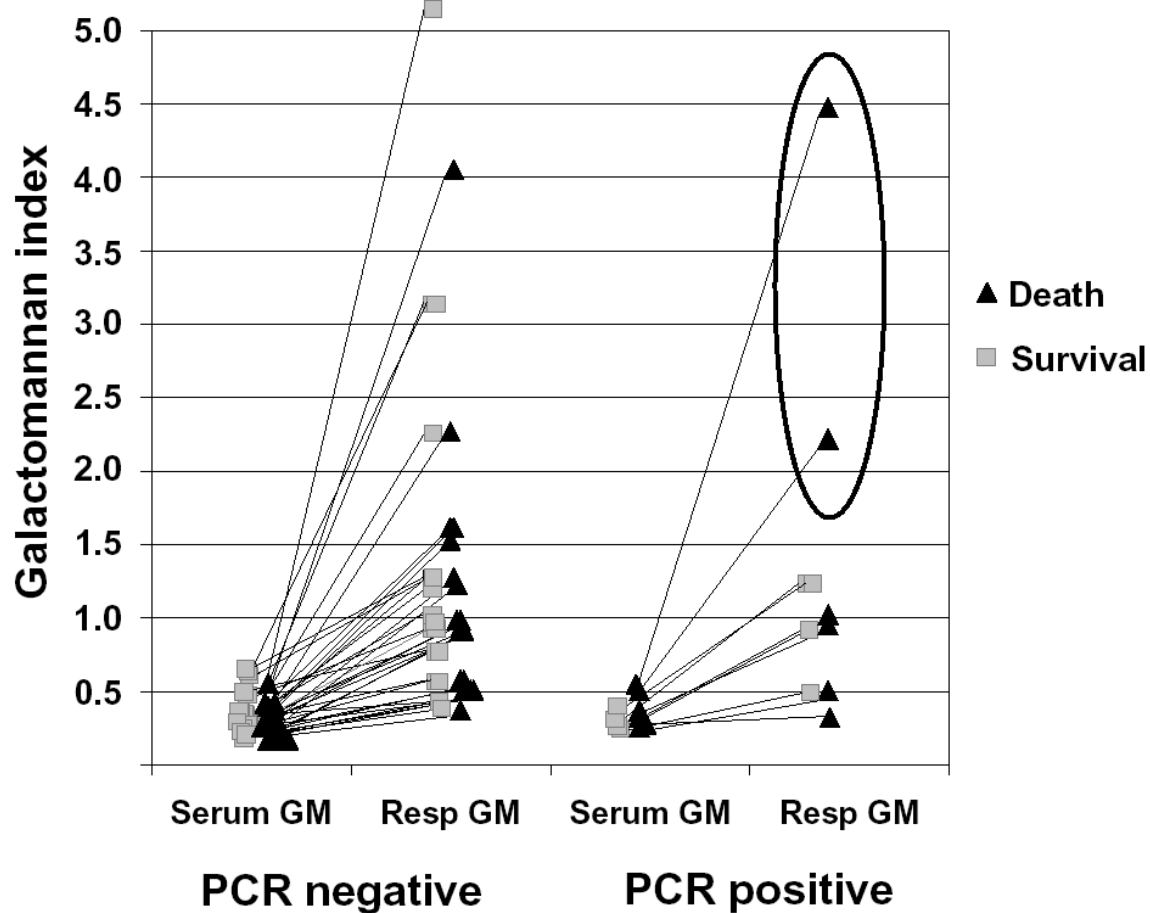
non-culturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease.
Clin Infect Dis 2011; 52:1123-9.

Table 1. Low frequency of IA in a prospective multicenter cohort study involving critically ill patients with COPD. Summary of the study main findings (data is presented in more detail in the main text).

Variable	Observation
GOLD staging and steroid dosage	This study enrolled mostly patients with severe COPD taking high doses of steroids. These patients were found in previous studies to be at high risk for IA
Microscopy and culture	Low incidence of IA (4.2%) based on conventional microbiological methods. Other identified fungi included <i>H. capsulatum</i> and <i>S. apiospermum</i>
IgE levels and <i>Aspergillus</i> precipitins	Total IgE levels of >500 IU/ml were observed in 8.5% but no patient had ABPA. Specific IgE against <i>Aspergillus</i> was not determined. <i>Aspergillus</i> precipitins did not detect IA cases
Serum GM	Zero sensitivity in the diagnosis of IA
GM in respiratory fluids	High frequency of false-positive results using currently accepted cut-off (0.5). Discrimination of IA from other causes of false-positive would probably require a higher cut-off (2.0 or more), preferably in combination with <i>Aspergillus</i> PCR
Real time PCR in respiratory fluids	Myconostica PCR was more sensitive to detect <i>Aspergillus</i> DNA, when compared to Nanogen <i>Aspergillus</i> PCR kit Myconostica PCR has a high negative predictive value.
Gold standard for diagnosis of IA in COPD patients in ICU	There is no universally applicable gold standard for the diagnosis of IA in COPD patients. Lung biopsy is impossible in this group. Autopsy is frequently not obtained, but confirmatory. Multiple negative tests probably rule out an IA diagnosis, but confirming the diagnosis with individual tests positive is problematic.

Legend: ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; IA, invasive aspergillosis; ICU, intensive care unit; PCR, polymerase chain reaction.

Figure 1. Distribution of galactomannan (GM) indices in the serum and in the respiratory tract, for both *Aspergillus* PCR-positive and PCR-negative patients. A high GM index in PCR-positive patients might help to differentiate *Aspergillus* infection from colonization.



Anexo 1

Protocolo *Aspergillus* - DPOC

Paciente: **Registro:**

UTI: () PPF () PSC () HSR () HCPA **Data de entrada na UTI:** / /

Idade: **Sexo:** () F () M **Peso:** kg **Altura:** m **IMC:**

Data da hospitalização:... / / **Data de entrada no estudo:** / /

DPOC: Estágio (GOLD): () 1 () 2 () 3 () 4

Último VEF1 (% do previsto): **Data:** / /

Tabagismo: () Sim () Não () Ex-tabagista, tendo parado há anos

Número de anos de tabagismo: **Cigarros/dia:**

Outras doenças de base:

Uso de drogas antibacterianas (últimos 14 dias): () Sim () Não

Quais drogas:

Quimioterapia (últimos 30 dias): () Sim () Não

Corticoterapia sistêmica: () Sim () Não

Qual droga, dose e duração:

Corticoterapia inalatória: () Sim () Não **Ventilação mecânica (nº dias):**

Achados microbiológicos:

Exame direto (espécime resp):

Exame cultural:

Outros (hemocultura / urocultura):

Exames de imagem (resultados):

Exames endoscópicos (resultados):

Colonizado por *Aspergillus* antes de entrar no estudo:() Sim () Não

Imunodifusão para *Aspergillus*: () Positiva, título 1/..... () Negativa

Galactomanana (título no soro):

Galactomanana (título em espécime resp): ..() LBA () Escarro() Asp. traqueal

PCR em tempo real:

Óbito durante a internação: () Sim () Não **Data do óbito / alta:** / /

Anexo 2



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-251

Versão do Projeto: 03/07/2008

Versão do TCLE: 10/07/2008

Pesquisadores:

LUCIANO ZUBARAN GOLDANI

ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO

LUIZ CARLOS SEVERO

VALERIO RODRIGUES AQUINO

SERGIO PINTO RIBEIRO

MARCELLE REESINK CERSKI

Anexo 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título: Comparação dos testes de galactomanana e de PCR em tempo real no diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva em pacientes não-neutropênicos admitidos em UTI

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa onde será avaliado o desempenho de dois novos testes para o diagnóstico de aspergilose, uma pneumonia causada por fungos. Embora aspergilose em geral afete imunocomprometidos, pacientes que já possuam outra doença no pulmão e que manifestem pneumonia enquanto internados na UTI estão também sob risco, em especial se usam corticóide por qualquer motivo. A maior parte dos casos de aspergilose em pacientes na UTI não é diagnosticada pelos métodos hoje disponíveis.

Este estudo comparará dois novos testes para o diagnóstico de aspergilose (ELISA duplo-sanduíche e PCR em tempo real), além de determinar quantos pacientes na UTI possuem esta doença. A idéia é tentar diagnosticar esta doença em estágio inicial. O estudo será conduzido na Santa Casa de Porto Alegre e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O projeto é coordenado pelo Dr. Alessandro Pasqualotto, médico infectologista e professor de Pós-graduação da Universidade Federal do RS.

Você não é obrigado a participar e nenhuma forma de pagamento ocorrerá no estudo. A decisão de não participar não afetará seu tratamento ou relação com seus médicos de maneira alguma. Todas as informações permanecerão confidenciais e nada será divulgado sem o seu consentimento.

Será preciso que você assine duas vias deste termo. Uma ficará com você e a outra com o médico do estudo. Apenas utilizaremos uma parte da secreção pulmonar que seu médico enviar para exame ao laboratório na rotina assistencial. Se necessário, poderemos colher uma amostra de sangue, para realização de testes para investigar se aspergilose está presente. Todos os resultados serão repassados ao seu médico, a quem caberá as decisões sobre o seu tratamento.

Todas as informações do estudo são sigilosas, incluindo seu nome, sua doença e resultado de seus exames.

Os resultados do estudo serão publicados e/ou apresentados em revistas médicas e congressos internacionais. Ainda, servirão como tese de doutorado para Valério Rodrigues Aquino.

A entrada no estudo não trará qualquer custo a você ou ao hospital.

Você pode fazer perguntas a qualquer momento sobre este estudo ao Dr. Luciano Zubaran Goldani (coordenador do projeto no HCPA) pelo telefone 2101 8841. Em caso de dúvidas adicionais sobre este termo ou seus direitos, favor contactar o **Grupo de Pesquisa e pós-graduação - Comitê de ética GPPG-HCPA**, pelo número **51 21018304**.

Li e compreendi as informações e estou de acordo em participar do estudo.

Nome do paciente ou representante, data e assinatura.

Anexo 4



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



PARECER Nº 137/09

Protocolo CEP nº: 1796/08

Data de Entrada: 12/02/08

Pesquisador Responsável: Dr. Alessandro C. Pasqualotto

Instituição: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

O Comitê de Ética em Pesquisa da **IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE PORTO ALEGRE** CEP/ISCMPA, no uso de suas atribuições, conforme Regimento Interno, avaliou e aprovou em 01/04/09 o documento ref. ao projeto de pesquisa intitulado, “*Comparação dos testes de galactomanana e de PCR em tempo real no diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva em pacientes não-neutropênicos admitidos em unidade de terapia intensiva (UTI)*”, considerando que os mesmos atendem as exigências previstas na legislação vigente do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, demonstradas através do documento abaixo aprovado e parecer transcrito:

“*Após avaliação das alterações efetuadas no estudo acima descrito, o presente Comitê não encontrou óbices quanto à implementação das mesmas*”.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Versão II datada de 23/Mar./2009.

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa:

- Dr. Cláudio Telöken, médico – Coordenador do CEP
- Dr. João Carlos Goldani, Médico
- Dr. Rodolfo Coutinho Radke, Médico
- Dr. Marcelo Garcia da Rocha, Médico – Vice–Coordenador do CEP
- Dra. Elizete Keitel, Médica
- Dr. Carlos Franco Voegeli, Especialista em Análises Clínicas
- Léria Rosane Holsbach, Engenheira Clínica
- Norma Elisabeth R. Heinzelman, Usuária da Instituição
- Vera Maria Santafé, Especialista em Análise Clínicas
- Jocimar Prates Muller, Fisioterapeuta
- Elen Maria Bandeira Borba, Rep. Conselho Municipal de Saúde
- Eduardo da Silva Santos, Padre
- Carolina Koch, Advogada

Porto Alegre, 01 de Abril de 2009.

Dr. Cláudio Telöken
Coordenador do CEP- ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.

Anexo 5**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

TÍTULO: Comparação dos testes de galactomanana e de PCR em tempo real no diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva em pacientes não-neutropênicos admitidos em UTI

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa onde será avaliado o desempenho de dois novos testes para o diagnóstico de aspergilose, uma pneumonia causada por fungos. Embora aspergilose em geral afete indivíduos com as defesas baixas (em geral como resultado de câncer ou transplante), pacientes com defesas normais, mas que possuam doença no pulmão e que manifestem pneumonia enquanto internados na UTI estão também sob risco, em especial se usam corticóide. A maior parte dos casos de aspergilose em pacientes na UTI não é diagnosticada pelos métodos hoje disponíveis.

Este estudo comparará dois novos testes para o diagnóstico de aspergilose (ELISA duplo-sanduíche e PCR em tempo real), além de determinar quantos pacientes na UTI possuem esta doença. A idéia é tentar diagnosticar esta doença em estágio inicial.

Você não é obrigado a participar e nenhuma forma de pagamento ocorrerá no estudo. A decisão de não participar não afetará seu tratamento ou relação com seus médicos de maneira alguma. Todas as informações permanecerão confidenciais e nada será divulgado sem o seu consentimento.

Será preciso que você assine duas vias deste termo. Uma ficará com você e a outra com o médico do estudo. Apenas utilizaremos uma parte da secreção pulmonar que seu médico enviar para exame ao laboratório na rotina assistencial. Será colhida também uma única amostra de sangue (5 ml) para realização de testes para investigar se aspergilose está presente. Todos os resultados serão repassados ao seu médico, a quem caberá as decisões sobre o seu tratamento. Todas as informações do estudo são sigilosas, incluindo seu nome, sua doença e resultado de seus exames. A entrada no estudo não trará qualquer custo a você ou ao hospital.

Você pode fazer perguntas a qualquer momento sobre este estudo ao Dr. Alessandro Pasqualotto (coordenador do projeto) pelo telefone 51 99951614 ou Valério Aquino (99611141). Em caso de dúvidas adicionais sobre este termo ou seus direitos, favor contactar o **Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre**, pelo número **51 32148571**.

Li e compreendi as informações e estou de acordo em participar do estudo.


Nome do paciente ou representante, data e assinatura.

Nome do pesquisador que aplicou este termo, data e assinatura.


Anexo 6

Projeto de Doutorado - PPG Pneumologia - UFRGS


Comparação dos Testes de Galactomanana e de PCR em Tempo Real no Diagnóstico de Aspergilose Pulmonar Invasiva em Pacientes não-neutropênicos admitidos em UTI



DPOC em VM
+
Uso de Corticosteróides
Novo infiltrado pulmonar



- Aplicar Termo de Consentimento



Favor avisar um dos pesquisadores do estudo:

- Alessandro Pasqualotto (99951614 / 32148645 / acpasqualotto@hotmail.com)
- Valério Aquino (99611141/ 33598452 / vaquino@hcpa.ufrgs.br)

Anexo 7

DETALHAMENTO DOS MÉTODOS DO ESTUDO.

MATERIAIS E MÉTODOS

DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte prospectivo multicêntrico.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Santa Casa Complexo Hospitalar (UTI central e UTI do Pavilhão Pereira Filho).

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- ✓ Diagnóstico de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC);
- ✓ Uso de corticosteróides;
- ✓ Ventilação mecânica;
- ✓ Novo infiltrado pulmonar.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- ✓ Pneumonia crônica;
- ✓ Uso recente (< 14 dias) de droga anti-fungo filamentoso;
- ✓ Doença hematológica;
- ✓ Neutropenia;
- ✓ Transplantado de órgão sólido.

AMOSTRAS

Para todos os pacientes incluídos neste estudo, foram obtidas amostras de soro (800-1000 µl) e de material do trato respiratório, incluindo aspirado traqueal (45 pacientes) e lavado broncoalveolar (2 pacientes). O material foi coletado pela equipe assistencial da UTI de onde o paciente estava internado por meio de sonda de aspiração traqueal (Aspirado traqueal) e LBA conforme técnica padronizada. Após coletado, o material foi aliquotado e armazenado em freezer a menos 80°C.

EXAMES REALIZADOS NAS AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS

Exame micológico direto

Foi colocado uma quantidade de amostra em uma lâmina, adicionado hidróxido de potássio a 20°C e, após uma hora, observado a preparação visando observar a presença de hifas hialinas septadas.

Cultivo micológico

Foi colocado um volume de 100 µL de amostra em uma placa de Sabouraud e semeado por esgotamento. Posteriormente, foi observado o crescimento de colônias de *Aspergillus* sp e realizada a quantificação. Cada colônia corresponde a 10 Unidades Formadoras de Colônias por mililitros (UFC/mL). Concomitantemente, foi semeada uma alíquota em Sabouraud com cloranfenicol, e incubada a 25 e 35°C.

DETECÇÃO DE GALACTOMANANA EM AMOSTRA RESPIRATÓRIA

Platelia *Aspergillus* EIA é uma determinação imunoenzimática, em microplacas de uma só etapa que detecta o antígeno galactomanana (GM). É um método que se utiliza de anticorpos (AC) monoclonais EBA-2 de rato, que se dirigem contra epítomos de galactofuranose na molécula de GM.

O fabricante utiliza anticorpos monoclonais para recobrir os poços nas microplacas e unir-se ao antígeno a ser detectado unido a microplaca sensibilizada. As amostras são tratadas previamente com calor em presença de EDTA, para dissociar os complexos imunes e precipitar as proteínas que poderiam interferir na prova. As amostras tratadas e o conjugado são adicionados aos poços recobertos com anticorpos monoclonais, que posteriormente são incubadas. Na presença do antígeno galactomanana, ocorre a formação de um complexo anticorpo monoclonal-galactomanana-anticorpo monoclonal/peroxidase.

Posteriormente, realizou-se uma lavagem nas placas, para eliminar o material não usado na reacção. Adicionou-se o substrato para reagir com complexos ligados ao poço, com formação de uma reacção azul. A adição do ácido detém a reacção enzimática e muda a cor para amarelo. A absorbância (densidade óptica) das amostras e controles foram determinadas em espectrofotómetro.

Para realização do teste, foi utilizado o kit comercial Platelia™ Aspergillus EIA® (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) conforme técnica a seguir:

Tratamento da Amostra Clínica

Todos os soros controles (R3, R4 e R5) foram processados simultaneamente às amostras clínicas.

1. Pipetar 300 µL de cada amostra e controles em tubos de polipropileno de 1,5 mL;
2. Adicionar 100 µL de solução de tratamento do soro (R7) a cada tubo;
3. Fechar bem a tampa para evitar que se abra durante o aquecimento;
4. Misturar em agitador tipo Vortex;
4. Aquecer os tubos durante 6 minutos em bloco térmico a 120°C. Os tubos devem ser introduzidos somente quando o bloco térmico atingir a temperatura indicada;
5. Retirar com cuidado os tubos aquecidos do bloco ou do banho e introduzir na centrífuga a 10.000g durante 10 minutos. (aproximadamente 10.000 rpm);
6. O sobrenadante será usado para detecção do GM;
7. Após preparação o sobrenadante pode ser armazenado a 2-8°C até 48 horas antes da análise;

NOTA: O cumprimento estrito da temperatura, tempos indicados e uso do material recomendado são essenciais para o êxito da análise. Deve-se comprovar a temperatura do bloco térmico, usando um termômetro calibrado encaixado dentro de um tubo com óleo mineral, onde dentro deve-se alcançar 100 °C.

Procedimento do Ensaio Imunoenzimático

1. Estabilizar os reativos a temperatura ambiente (18-25°C) por 15 minutos antes do uso;
2. Preparar a solução de lavagem, solução do substrato cromógeno e controles conforme indicações do fabricante;
3. Identificar os controles (R3, R4 e R5);
4. Retirar o suporte da placa e as tiras com os micropoços (R1), e devolver imediatamente as tiras que não serão utilizadas para a geladeira;
5. Misturar o conteúdo do frasco conjugado (R6) invertendo antes do uso. Adicionar 50 µL de conjugado a cada poço. Após, adicionar 50 µL do sobrenadante tratado da amostra em cada poço, como indicado anteriormente. Não adicionar as amostras aos poços antes do conjugado.
6. Cubrir a placa com o selador ou outro meio que impeça a evaporação e verificar se toda a superfície esta hermeticamente fechada;
7. Incubar a microplaca em um incubador seco de microplacas durante 90 +/- 5 minutos a 37°C (+/- 1°C);
8. Retirar o selador das placas. Aspirar o conteúdo do poço para um recipiente de resíduos com hipoclorito de sódio. Lavar a placa 5 vezes usando 370 µL de solução de lavagem. Após a última lavagem inverter a placa e bater suavemente para garantir a eliminação do líquido;
9. Adicionar rapidamente 200 µL de solução substrato-cromógeno (R8 + R9) em cada poço, evitando exposição a luz incidente;
10. Incubar a microplaca em ambiente protegido da luz à temperatura ambiente (18-25 C°), durante 30 +/- 5 minutos. Durante este passo, não colocar a película adesiva;
11. Adicionar 100 µL de solução de parada (R10) a cada poço na mesma ordem que

se adicionou a solução de substrato. Misturar bem;

12. Secar bem a base da placa;

13. Ler a Densidade óptica (D.O.) de cada poço a 450 nm (filtro de referência de 620 nm) até 30 minutos após a solução de parada. A placa é realizada em espectrofotômetro;

Controle Interno da Qualidade

- A Densidade óptica (D.O.) média (cut-off) deve estar entre 0,3 e $\leq 0,8$.
- Controle (+): Índice D.O. controle positivo (R5) / Média da D.O. do cut-off > 2
- Controle (-): Índice DO controle negativo (R3) / Média da DO do cut-off $< 0,4$

Se alguns dos controles não cumprir os critérios de validade expostos anteriormente, os resultados da prova não podem ser validados e os resultados dos pacientes não poderão ser correlacionados.

Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados de galactomanana em amostras respiratórias é tema de grande discussão na atualidade. Provavelmente a discriminação de resultados falso-positivos em amostras respiratórias exige um maior ponto de corte que amostras de soro (acima de 1,5).

PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS

Material: Aspirado traqueal e lavado broncoalveolar

Tão logo colhido, o material foi refrigerado a -80°C até o momento da extração do material nucléico, no Laboratório de Biologia Molécula da Santa Casa de Porto Alegre.

Extração do DNA

Para extração do DNA das amostras respiratórias, foi utilizado o kit comercial MycXtra Kit (Myconostica, Manchester, UK). A extração do consiste no primeiro passo da análise do DNA. Devido a complexidade estrutural dos fungos filamentosos e dificuldade em decompor a parede celular é necessário uma combinação de força mecânica e diversos processos de purificação.

O princípio da extração consiste na concentração do DNA por centrifugação e lise em tubo com esferas (*beads*), solução de lise e solução detergente para remoção dos inibidores da reação. O *kit* age através de uma combinação de calor, ação detergente e choque mecânico contra as esferas presentes no tubo, o que promove lise dos componentes celulares do microrganismo, precipitação das proteínas e ligação do DNA a um filtro de sílica. O filtro é lavado e o DNA recuperado em solução tamponada pronto para ser utilizado. O processo de extração do DNA fúngico é realizado em aproximadamente 2 horas.

Para validar o método de extração utilizamos algumas amostras do estudo que tínhamos mais volume e algumas de rotina sem suspeita de aspergilose invasiva, contaminadas com a cepa-padrão *Aspergillus fumigatus* 293. Após esta etapa, realizamos extração do DNA conforme protocolo acima descrito e enviamos para o laboratório de referência do prof. D. Denning, em Manchester (UK). A amostra batizada com *A.*

fumigatus foi positiva (Ct: 22,2), bem como a amostra clínica de paciente com cultura positiva para *A. fumigatus* (Ct: 35,5). O controle positivo apresentou um Ct:17,4 e o controle negativo: Ct:0.

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA

- a. Centrifuga
- b. Citocentrífuga
- c. Micropipetas de 40 µL, 100 µL , 1000 µL
- d. Agitador vortex *Genie 2* (scientific Industries) ou similar que pode ser colocado a placa de fixação dos tubos.
- e. Placa para fixação dos tubos

LIMITAÇÕES DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Conforme avaliado pelo fabricante, o *kit* MycXtra (Myconostica, Manchester, UK) possui eficiência da extração média de 8%.

Considerando-se o cut-off clínico para o parâmetro Ct como sendo 36, o método de amplificação teve sensibilidade de 0,94 e especificidade de 0,91, estabelecido em um estudo com 44 pacientes de 2 hospitais e de diferentes populações e comparados com a clínica dos pacientes. 0,91. Das amostras testadas, 0,8% continham inibidores após a extração (<http://www.myconostica.co.uk/ifus>).

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DO KIT COMERCIAL MycXtra -MYCONOSTICA.

Em amostras muito viscosas, foram adicionados 30 μL de proteinase K aos 800 μL de amostras e colocadas em banho maria a 56° durante 20 minutos, para facilitar o manuseio da amostra.

Protocolo do *kit*

1. Pipetar 800 μL de LBA em tubo fornecido pelo kit.
2. Centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm. Retire 750 μL do sobrenadante e ressuspenda o *pellet* nos 50 μL restantes.
3. Transfira os 50 μL com pipeta para o tubo com esferas (*beads*) de 2 mL. (As esferas auxiliam a homogeneização e ruptura da parede celular do *Aspergillus* sp).
4. Passe no vórtex suavemente (faça um spin para concentrar a amostra).
Checar se a solução S1 apresenta precipitado. Caso isto ocorra, aqueça na mão e passe no vortex suavemente.
5. Adicione 60 μL da solução S1 ao tubo com esferas, agite por inversão várias vezes.
6. Adicione 200 μL da solução IRS ao tubo com esferas.
7. Fixe os tubos horizontalmente no vortex apropriado e agite na velocidade máxima durante 10 minutos.
8. Centrifugue os tubos com esferas por 30 segundos a 13.000 rpm.
9. Transfira 450 μL do sobrenadante para um tubo de tubo limpo fornecido pelo kit (não feche)
10. Adicione 250 μL da solução S2, passe no vórtex 5 segundos e deixe a temperatura ambiente de 4-8 °C durante 5 minutos.

11. Centrifugar o tubo 1 minuto a 13.000.
 12. Evitando o *pellet* transfira todo o volume do sobrenadante para um tubo de tubo limpo fornecido pelo kit
 13. Adicione 1,2 mL (2 vezes de 600 mL) de solução S3 cuidadosamente pois o tubo ficará cheio. Passe no vórtex 5 segundos.
 14. Transfira aproximadamente 700 μ L para a coluna. Centrifugue por 30 segundos a 13.000 rpm.
 15. Repita a operação até que todo sobrenadante seja transferido (3 vezes)
- No spin final centrifugue 1 minuto a 13.000 rpm
16. Adicione 300 μ L da solução S4. Centrifugue durante 30 segundos a 13.000 rpm
 17. Descarte o filtrado sem trocar o tubo (o DNA ficará aderido ao filtro preso ao tubo).
 18. Coloque cuidadosamente a coluna em tubo limpo. Evite contaminação com S4 (centrifugar novamente a 13.000 durante 1 minuto para eliminar o S4)
 19. Adicione 40 μ L de solução S5
 20. Deixar a temperatura ambiente (25°C)
 21. Centrifugue durante 30 segundos a 13.000 rpm
 22. Descarte o filtro e armazene o DNA purificado a - 80°C

AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Foram utilizados 2 kits comerciais para amplificação do DNA de *Aspergillus*, previamente extraído com o kit MycXtra Kit (Myconostica, Manchester, UK). O *Aspergillus* spp q-PCR Alert kit (Nanogen, Torino, Itália) utilizando um sistema de detecção de sequencias ou termociclador em tempo real da Applied Biosystems 7500 (Foster City, EUA) e o kit MycAssay™ *Aspergillus* kit (Myconostica), em um SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, EUA). A primeira reação foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Porto Alegre, enquanto a segunda foi realizada no Reino Unido, nos laboratórios da Myconostica. Ambos os ensaios envolvem uma reação de amplificação em tempo real em uma microplaca com aquecimento programável e com sistema de detecção óptico de fluorescência (ciclo térmico para o tempo real).

AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DO KIT COMERCIAL *ASPERGILLUS* SPP Q-PCR ALERT KIT (NANOGEN, TORINO, ITÁLIA).

Termocilcador: Applied Biosystems 7500 (Foster City, EUA)

O kit *ASPERGILLUS* Q-PCR alert é utilizado para amplificação de ácidos nucleicos para detecção do DNA de *Aspergillus* spp. em amostras de DNA extraídas de amostras respiratórias. O teste pode identificar DNA de *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. versicolor* e *A. glaucus*.

O procedimento envolve uma reação de PCR em tempo real em microplaca e um equipamento com termostato programável com um sistema óptico de detecção fluorescente.

Em cada poço, uma reação de amplificação é executada para uma região do gene rDNA 18S de *Aspergillus* spp e para uma região do gene beta globina humana (controle interno da amostra) utilizando o DNA extraído das amostras respiratórias. Uma sonda específica para *Aspergillus* marcada com fluoróforo FAM é ativada quando hidrolisada pela enzima que faz a amplificação do produto específico. Uma outra sonda, específica para o gene beta globulina humana marcada com fluoróforo VIC, é ativada quando hidrolisada pela enzima que faz a amplificação do gene beta globulina humana. A emissão de fluorescência aumenta com o aumento do produto específico da reação de amplificação, é medido e registrado pelo aparelho. O processamento dos dados determina o título de DNA de *Aspergillus* presentes na amostra inicial.

A partir do momento que a probe Taqman® for ligada a parte específica do

gabarito de DNA após a desnaturação (alta temperatura) e refriamento da reação, ocorre o anelamento dos primers ao DNA. A TaqPolimerase então adiciona nucleotídeos e remove a probe TaqMan® do DNA gabarito. Isso separa o quencher do reporter, e permite a emissão de sua energia, que pode ser quantificada pelo sistema de leitura. Quanto mais ocorrer a desnaturação e anelamento, maior a ligação da TaqMan® e maior quantidade de luz será detectada.

O *kit* fornece além da microplaca de 96 poços para a amplificação uma mistura de primers de oligonucleotídeos (ASPERGILLUS Q-PCR ALERT AmpliMIX); uma mistura de sondas fluorescentes marcadas com FAM/MGB-NFQ e com VIC/MGB-NFQ , 4 soluções de plasmídeos para realização da curva padrão (ASPERGILLUS Q-PCR ALERT STANDARD 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) e o Q-PCR ALERT AmpliMASTER composto de uma mistura de reagente otimizados para a reação.

Para determinação do título do DNA d amostra, é necessário preparar uma série de reações utilizando DNA padrão com quantidades conhecidas de cópias para obtenção da curva padrão.

Com a finalidade de determinar a quantidade de DNA na amostra, coloca-se 4 amostras com concentrações conhecidas de cópias (Padrão 10^2 cópias ,Padrão 10^3 cópias, Padrão 10^4 cópias e Padrão 10^5 cópias) para obtenção de uma curva padrão. Além disso cada amplificação deve conter um controle positivo (padrão) e um controle negativo (água esterilizada).

Parâmetros do ciclo térmico para amplificação e um volume de 25µL no Applied Biosystems (Foster City, EUA).

Fase	Temperatura	Tempo
Descontaminação	50°C	2 minutos
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos
45 ciclos	95°C	15 segundos
	60°C	1 minuto

Preparo da amostra para amplificação

1. Transferir 100 µL do ASPERGILLUS Q-PCR Alert AmpliMIX para o tubo com o Q-PCR Alert AmpliMASTER. Misture bem e pipete 100 µL 3 vezes dentro da mistura;
2. Transferir 100 µL do ASPERGILLUS Q-PCR Alert AmpliPROBE para o tubo com o Q-PCR Alert AmpliMASTER. Misture bem e pipete 100 µL 3 vezes dentro da mistura;
3. Passe em vórtex em baixa rotação evitando formação de espuma;
4. Centrifugue o conteúdo por 5 segundos para concentrar o material;
5. Transferir 20 µL da mistura obtida nos poços para amplificação conforme estabelecido previamente em planilha;
6. Transferir 5 µL da amostra de DNA previamente extraído nos fundo dos poços para amplificação;
7. Transferir 5 µL de água ultra pura no controle negativo para amplificação;
8. Gentilmente coloque 5 µL da Q-PCR Standard 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 cópias na mistura nos poços para amplificação conforme estabelecido previamente em planilha;
9. Coloque o selo adesivo na placa

10. Transfira a placa para a área de amplificação/detecção e inicie o ciclo de amplificação térmica.

Interpretação dos resultados

Os valores registrados da fluorescência emitida pela sonda específica para *Aspergillus* spp (fluorescência FAM) e pela sonda específica para a beta-globina (fluorescência VIC) nas reações devem ser analisados no software específico.

O limiar (*Threshold*) da fluorescência FAM deve ser programado para 0,2.

O limiar (*Threshold*) da fluorescência FAM deve ser programado para 0,1.

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda FAM específica para *Aspergillus* spp. nas reações de amplificação dos 4 DNA padrões com quantidades conhecidas são utilizados para calcular a curva padrão da sessão de amplificação e para validar a amplificação e detecção.

O coeficiente de correlação (R^2) para a curva padrão *Aspergillus* spp (FAM) tem uma faixa relativamente estreita de aceitação ($0,990 \leq R^2 \leq 1,000$) para aceitabilidade da amplificação e detecção do DNA.

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda específica para *Aspergillus* spp. durante a amplificação do controle negativo e a curva padrão são utilizados para calcular a quantidade (Quantity) de DNA alvo eventualmente presente na reação e para validar a amplificação e detecção de DNA.

O resultado do controle negativo *Aspergillus* spp. (FAM) com uma quantidade de DNA não detectado ou *baseline* inferior a 7 cópias demonstra que o processo de validação/amplificação e detecção na amostra foi correto.

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda específica para *Aspergillus* spp. nas reações de amplificação de cada amostra e a curva padrão são utilizados para calcular a

quantidade de DNA alvo.

Os valores de fluorescência emitidos pela sonda específica para o teste interno adequado (beta-globina) nas reações de amplificação de cada amostra e o valor limiar de fluorescência são utilizados para determinar o ciclo limiar (Ct) do DNA alvo.

A quantidade de *Aspergillus* spp. e o Ct do gene humano da beta-globina são utilizados para validar a amplificação e detecção, o *kit* pode dosar de 10 a 1.000.000 (10^5) de cópias de DNA do gene rDNA 18S, por amplificação.

AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DO KIT COMERCIAL MYCXTRA KIT (MYCONOSTICA, MANCHESTER, UK).

Termociclador: SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, EUA).

MycAssayTMAspergillus é utilizado para detecção qualitativa do DNA genômico de *Aspergillus* spp. extraído de amostra respiratória baseado na tecnologia de PCR com sinais moleculares (*molecular beacons*).

Molecular beacons são sondas de hibridização de oligonucleotídeos que identificam a presença de ácidos nucleicos específicos em soluções homogêneas. São moléculas em forma de grampo com um fluoróforo interno que é restaurado quando se liga a seqüência de ácido nucleico alvo. Neste modelo o oligonucleotídeo utilizado como *probe* sintetizado de modo a possibilitar a formação de uma estrutura secundária entre as extremidades 5' e 3'. Toda nova fita gerada durante a amplificação é alvo para o anelamento do *beacon*, aumentando a intensidade da fluorescência.

A mistura de reagentes do MycAssayTMAspergillus consiste em:

- a. Um tubo contendo dNTPs, MgCl₂ e solução tamponada com o complexo de DNA polimerase;
- b. Um tubo com a seqüência alvo, sinais moleculares e controle de amplificação interno que consiste em um plasmídeo de DNA recombinante que abriga uma seqüência não relacionada com a seqüência alvo (*Aspergillus*) e um tampão;
- c. Um controle negativo que consiste em água destilada;
- d. Um controle positivo que consiste em um plasmídeo recombinante que abriga a seqüência alvo (porção do gene 18S ribossomal) do *Aspergillus*.

Segundo a Myconostica a avaliação de desempenho do teste foi realizada em amostras clínicas colhidas em 2 hospitais e comparadas com diagnóstico clínico e de cultivo. O fabricante não especifica a população estudada, mas certamente teremos variações nas quantidades de DNA de acordo com a doença de base estudada.

Quando comparado PCR e diagnóstico clínico os valores de sensibilidade e especificidade foram de 0,94 e 0,91 de respectivamente. O valor preditivo positivo foi de 0,97 e o valor preditivo negativo de 0,83. Quando comparado PCR versus cultivo de *Aspergillus* os valores de sensibilidade e especificidade foram de 0,94 e 0,77 de respectivamente. O valor preditivo positivo foi de 0,91 e o valor preditivo negativo de 0,83.

Das amostras testadas (44), 0,8% continham inibidores de PCR conforme indicado pelo controle de amplificação interno.

Em nosso estudo uma amostra do DNA extraído (20 µL) foi enviado para Manchester para realização do PCR em tempo real com o kit MycAssayTM *Aspergillus* kit (Myconostica) em um SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, EUA). Os resultados foram retornados pela Dra. Caroline B. Moore conforme tabela 6 do anexo 8.

EXAMES REALIZADOS NO SORO

IgE total

Foi encaminhado ao Laboratório Central da Santa Casa uma alíquota de soro para dosagem de IgE (Imunoglobulina E) total pelo método de quimiluminescência.

Valores de referência

Acima de 15 anos: até 158 UI/mL

Galactomanana no soro

Ver procedimento em amostra respiratória

Interpretação dos resultados de Galactomanana no soro

A presença ou ausência de antígeno galactomanana na amostra em estudo se determina calculando um índice para cada amostra de paciente. O índice (I) é a D.O. da amostra dividida pela D.O. média dos poços que contém os soros controles do cut-off.

As amostras com índice $< 0,5$ são consideradas negativas. Os resultados negativos (abaixo do nível detectável) não descartam AI.

As amostras com índice $\geq 0,5$ são consideradas positivas. Os resultados positivos devem ser valorizados juntamente com outros procedimentos diagnósticos como cultivo, histologia e dados radiológicos.

Valores de Referência

Negativo: $< 0,5$

Positivo: $\geq 0,5$

Imunodifusão para *Aspergillus*

Testagem para anticorpos do tipo IgG precipitantes contra *A. fumigatus* foi realizado no soro dos pacientes pela Dra Melissa Xavier no laboratório da Universidade de Rio Grande, através do teste de difusão dupla. Os resultados foram quantificados através de diluições seriadas a partir da amostra original. A razão pela qual este teste não é usualmente empregado no diagnóstico de aspergilose invasiva é o fato de a maioria dos pacientes testados serem imunocomprometidos, que tendem a demonstrar resposta sorológica lenta ou ausente. Em cada reação é adicionado um controle positivo (*Aspergillus fumigatus*).

Anexo 8

Resultados adicionais do estudo

Foram avaliados 47 pacientes com diagnóstico clínico de DPOC, sob uso de corticosteróides e ventilação mecânica. Em 28 pacientes foram avaliados os critérios clínicos e funcionais (espirometria). Seis pacientes apresentaram história clínica compatível com asma na infância anteriormente ao diagnóstico de DPOC.

a seguir apresentamos algumas tabelas que mostram características basais dos pacientes incluídos no estudo, doenças associadas, uso de antibióticos, dados de exames realizados, exames microbiológicos e micológicos, resultados do galactomanana e PCR e dados do desfecho dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 1. Características basais dos pacientes incluídos no estudo

Paciente	Idade	Sexo	Tabagismo	Anos maço	IMC	VEF ₁ (L)	VEF ₁ /CVF	GOLD	Asma
1	69	Masc	Sim	100	ND	ND	ND	4*	Não
2	82	Fem	Sim	ND	21,5	ND	ND	4*	Não
3	75	Masc	Ex-fumante	90	21,1	1,98	0,61	2	Não
4	76	Fem	Sim	30	38,0	ND	ND	2	Não
5	68	Fem	Sim	ND	25,0	ND	ND	ND	Não
6	88	Masc	Não	ND	27,2	1,18	0,59	2	Não
7	70	Masc	Ex-fumante	100	22,2	1,30	0,50	3	Não
8	75	Masc	Sim	ND	18,3	ND	ND	ND	Não
9	71	Fem	Ex-fumante	50	ND	0,9	0,70	3	Não
10	65	Fem	Ex-fumante	ND	29,5	ND	ND	4*	Não
11	61	Fem	Sim	160	30,0	2,08	0,78	4	Não
12	79	Fem	Ex-fumante	ND	24,7	ND	ND	ND	Não
13	73	Masc	Ex-fumante	69	22,7	1,73	0,77	2	Não
14	58	Masc	Sim	ND	23,5	ND	ND	ND	Não
15	52	Masc	Sim	ND	23,8	ND	ND	ND	Não
16	68	Fem	Sim	ND	20,3	ND	ND	4*	Não
17	83	Masc	Sim	ND	23,9	2,22	0,58	2	Sim
18	72	Masc	Sim	20	18,0	1,76	0,33	4	Não
19	67	Masc	Sim	40	27,8	3,16	0,40	4	Não
20	64	Fem	Sim	50	28,5	0,99	ND	2	Não
21	49	Masc	Sim	ND	29,4	1,40	0,43	4	Sim
22	75	Masc	Sim	150	29,4	52	0,81	2	Não
23	61	Fem	Ex-fumante	ND	25,0	ND	ND	ND	Não
24	57	Masc	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	Não
25	66	Masc	Ex-fumante	ND	19,7	2,86	0,40	4	Não
26	72	Masc	Sim	120	32,0	2,72	0,53	4	Sim
27	73	Fem	Ex-fumante	ND	29,2	ND	ND	4*	Não
28	58	Masc	Sim	40	31,0	0,75	0,41	4	Não
29	74	Masc	Sim	40	21,8	1,02	0,70	2	Não
30	51	Masc	Sim	20	29,0	4,21	0,55	4	Sim
31	69	Masc	Ex-fumante	20	19,7	0,77	0,29	4	Não
32	64	Masc	Sim	ND	23,4	2,29	0,81	4	Não
33	65	Fem	Ex-fumante	50	22,0	0,75	0,53	4	Não
34	68	Masc	Sim	75	ND	ND	ND	ND	Não
35	75	Masc	Sim	120	23,9	ND	ND	ND	Não
36	65	Masc	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	Não
37	62	Masc	Sim	30	22,0	0,51	0,56	4	Sim
38	51	Masc	Ex-fumante	ND	16,2	ND	ND	ND	Não
39	88	Fem	Sim	69	17,7	0,76	ND	3	Não
40	70	Masc	Ex-fumante	30	22,1	0,92	0,43	3	Não
41	75	Fem	Ex-fumante	150	20,5	0,5	0,53	4	Não
42	56	Fem	Sim	39	23,8	2,21	0,72	1	Não
43	79	Fem	Sim	41	32,8	0,72	0,54	3	Sim
44	85	Fem	Sim	ND	35,8	0,92	0,67	ND	Não
45	50	Masc	Sim	ND	24,5	ND	ND	ND	Não
46	72	Fem	Ex-fumante	35	28,3	0,51	0,40	4	Não
47	80	Fem	Ex-fumante	ND	22,1	ND	ND	4*	Não

Legenda: Fem, Feminino; FEV₁, Volume expiratório forçado no primeiro segundo; FEV₁/CVF, razão entre o volume expiratório forçado no primeiro segundo e a capacidade vital forçada; GOLD, classificação da doença pulmonar obstrutiva crônica de acordo com o estágio de GOLD; IMC, Índice de massa corporal; Masc, Masculino; ND, Dado não disponível.

*Pacientes sem critérios funcionais para avaliação, uso de O₂ Domiciliar

Tabela 2. Doenças associadas

Paciente	1	2	3
1	-	-	-
2	HAS	CA pulmão	-
3	CA pulmão	CA cólon	Insuficiência renal crônica
4	Diabetes	HAS	-
5	Diabetes	HAS	-
6	CA prostata	-	-
7	CA pulmão	Lobectomia à direita	-
8	CA lingua	-	-
9	Cardiopatia	Infecção Influenza H ₁ N ₁	-
10	Diabetes	HAS	Estenose traqueal
11	Diabetes	HAS	Cardiopatia
12	HAS	CA pulmão	-
13	Cardiopatia	CA pulmão	-
14	HAS	Cardiopatia	-
15	Cardiopatia	Epilepsia	-
16	Diabetes	-	-
17	Diabetes	Cardiopatia	-
18	-	-	-
19	HAS	Cardiopatia	-
20	CA pulmão	-	-
21	Cardiopatia	Trombose	-
22	Diabetes	HAS	Vasculopatia
23	CA cólon	-	-
24	Lobectomia	-	-
25	Diabetes	HAS	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	HAS	TB	Cirrose
29	HAS	Cardiopatia	-
30	Diabetes	HAS	Cirrose
31	HAS	Cardiopatia	-
32	Epilepsia	-	-
33	HAS	-	-
34	Diabetes	HAS	-
35	CA pulmão	-	-
36	Diabetes	HAS	-
37	HAS	-	-
38	TB	-	-
39	Cardiopatia	Trombose (TVP)	-
40	Diabetes	Hepatopatia	Cardiopatia
41	Artroplastia de quadril	-	-
42	CA pulmão	Lobectomia	-
43	Diabetes	HAS	Cardiopatia
44	Diabetes	HAS	Cardiopatia
45	CA pulmão	-	-
46	-	-	-
47	Diabetes	HAS	-

Legenda: CA, Carcinoma; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; TB: Tuberculose; TVP: trombose venosa profunda.

Tabela 3. Uso de antibióticos

Paciente	ATB	1	2	3	4	5
1	2	CXM	CPM	-	-	-
2	3	Vanco	Pipe/tazo	CPM	-	-
3	3	IMP	Pipe/tazo	Sulfa	-	-
4	3	CXM	Azit	Amoxa/clav	-	-
5	2	CXM	Azit	-	-	-
6	3	IMP	Pipe/tazo	Amp/sulb	-	-
7	3	Vanco	CPM	Amp/sulb	-	-
8	4	Vanco	Pipe/tazo	IMP	Polimixina	-
9	5	Vanco	Pipe/tazo	IMP	Azit	Amp/sulb
10	2	Vanco	Pen	-	-	-
11	3	Vanco	CXM	Amoxa/Clav	-	-
12	3	IMP	Pipe/tazo	CXM	-	-
13	3	MEM	Pipe/tazo	Polimixina	-	-
14	3	MEM	Pipe/tazo	IMP	-	-
15	2	Azit	Amp/sulb	-	-	-
16	4	Vanco	MEM	CPM	Sulfa	-
17	5	Vanco	IMP	Pipe/tazo	CPM	Ertapenem
18	2	CPM	Azit	-	-	-
19	4	CXM	Pipe/tazo	Azit	Amp/sulb	-
20	4	Vanco	MEM	CPM	CFZ	-
21	3	Pipe/tazo	CPM	Amp/sulb	-	-
22	2	IMP	Pipe/tazo	-	-	-
23	3	Vanco	Pipe/tazo	CFZ	-	-
24	5	Vanco	IMP	Pipe/tazo	CFZ	Amp/sulb
25	3	IMP	Azit	Amp/sulb	-	-
26	2	Pipe/tazo	Azit	-	-	-
27	3	Pipe/tazo	CPM	Amp/sulb	-	-
28	3	CPM	Azit	Ampic/sulb	-	-
29	2	Pipe/tazo	Amoxa/clav	-	-	-
30	4	Vanco	IMP	Pipe/tazo	CXM	-
31	4	Vanco	Ertapenem	Pipe/tazo	CXM	-
32	1	Levo	-	-	-	-
33	7	Vanco	IMIP/MEM	Cefep/Cefurox	Pipe/tazo	CPM
34	2	CPM	CXM	-	-	-
35	4	Vanco	MEM	Pipe/tazo	Levo	-
36	4	Vanco	CPM	Pipe/tazo	CXM	-
37	3	Vanco	IMP	Amoxa/Clav	-	-
38	3	Vanco	IMP	MEM	-	-
39	4	Vanco	IMP	Pipe/tazo	CPM	-
40	4	Vanco	IMP	Sulfa	Polimixina	-
41	2	Pipe/tazo	Sulfa	-	-	-
42	3	CPM	Pen	Azit	-	-
43	3	Pipe/tazo	CPM	Amp/sulb	-	-
44	2	CXM	Azit	-	-	-
45	5	Vanco	IMP	Pipe/tazo	Amoxa/clav	Azit
46	5	Pipe/tazo	CPM	Azit	Eritro	Amoxa/clav
47	2	vanco	MEM	-	-	-

Legenda: ATB: Número de antibióticos; Amoxa/clav: Amoxicilina/Clavulanato; Azit: Azitromicina ; CFZ: Cefazolina; CXM: Cefuroxima; CPM: Cefepima; Eritro: Eritromicina; IMP: Imipenem; Levo: Levofloxacino; Pipe/tazo: Piperacilina/tazobactam; Pen: Penicilina; Sulfa: Sulfonamida; MEM: Meropenem; Vanco: Vancomicina

Tabela 4. Exames

Paciente	Eosinófilos	Eosin %	IgE (soro)	Precipitina	GM_soro	GM_resp
1	0	0,0	2	Negativa	0,18	0,4
2	222	1,0	54	Negativa	0,42	4,4
3	56	0,6	87	Negativa	0,16	0,4
4	0	0,0	178	Negativa	0,22	0,6
5	0	0,0	20	Negativa	0,59	1,3
6	104	1,0	44	Negativa	0,31	2,2
7	230	11,0	799	Negativa	0,27	1,2
8	29	0,1	399	Negativa	0,36	0,5
9	0	0,0	116	Negativa	0,38	1,2
10	169	0,6	34	Negativa	0,45	0,7
11	280	2,0	3	Negativa	0,28	3,1
12	19	0,1	197	Negativa	0,33	1,5
13	56	0,4	6	Positiva	0,27	1,5
14	11	0,1	62	Positiva	0,26	0,3
15	41	0,4	210	Negativa	0,19	1,3
16	0	0,0	36	Negativa	0,18	0,6
17	0	0,0	144	Negativa	0,23	0,5
18	220	1,0	75	Negativa	0,14	0,2
19	9	0,1	74	Negativa	0,40	0,9
20	0	0,0	37	Positiva	0,18	0,6
21	129	0,7	704	Negativa	0,38	0,8
22	192	3,0	2.642	Negativa	0,13	0,3
23	172	1,0	22	Negativa	0,51	1,2
24	0	0,0	5	Negativa	0,26	0,7
25	543	3,3	3.000	Negativa	0,57	3,1
26	570	7,0	180	Negativa	0,18	0,5
27	31	0,2	171	Negativa	0,10	0,2
28	123	1,0	54	Negativa	0,20	0,4
29	108	1,0	63	Negativa	0,32	0,4
30	0	0,0	70	Negativa	0,18	0,7
31	59	0,3	96	Negativa	0,21	1,1
32	498	5,7	100	Negativa	0,29	2,2
33	0	0,0	7	Negativa	0,32	1,4
34	0	0,0	105	Negativa	0,42	4,0
35	51	1,8	23	Negativa	0,28	0,5
36	0	0,0	9	Negativa	0,44	0,7
37	0	0,0	70	Negativa	0,41	2,1
38	219	1,0	70	Negativa	0,30	0,7
39	20	0,1	121	Negativa	0,19	0,3
40	35	0,3	183	Negativa	0,32	1,1
41	0	0,0	173	Negativa	0,41	0,8
42	88	0,4	226	Negativa	0,21	0,8
43	23	0,2	107	Negativa	0,24	5,2
44	70	0,8	135	Negativa	0,22	1,3
45	11	0,1	10	Negativa	0,20	0,4
46	23	0,1	10	Negativa	0,28	0,7
47	49	0,4	15	Negativa	0,32	0,8

Legenda: Eosin_%, Percentual de eosinófilos; GM_soro, Índice de galactomanana no soro; GM_resp, Índice de galactomanana em amostra respiratória.

Tabela 5. Exames Bacteriológicos e Micológicos

PACIENTE	BACTERIOLOGIA	MICOLOGIA
1	Negativa	Negativa
2	Negativa	<i>Aspergillus</i> seção <i>Fumigatti</i>
3	Negativa	Negativa
4	Negativa	Negativa
5	Negativa	Negativa
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativa
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Aspergillus</i> seção <i>Fumigatti</i>
8	Negativa	Negativa
9	Negativa	Negativa
10	<i>Proteus mirabilis</i>	Negativa
11	Negativa	Negativa
12	Negativa	Negativa
13	Negativa	<i>Histoplasma capsulatum</i>
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa
15	<i>Escherichia coli</i>	Negativa
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativa
20	Negativa	Negativa
21	Negativa	<i>Candida</i> sp em hemocultura
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativa
23	Negativa	Negativa
24	Negativa	Negativa
25	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativa
26	Negativa	Negativa
27	<i>Serratia sp</i>	Negativa
28	Negativa	Negativa
29	Negativa	Negativa
30	Negativa	Negativa
31	Negativa	Negativa
32	Negativa	Negativa
33	Negativa	Negativa
34	Negativa	Negativa
35	Negativa	Negativa
36	Negativa	Negativa
37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa
38	<i>Pseudomonas sp</i> e <i>Stenotrophomonas sp</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>
39	Negativa	Negativa
40	Negativa	Negativa
41	<i>Acinetobacter</i> e <i>Stenotrophomonas</i>	Negativa
42	Negativa	Negativa
43	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativa
44	Negativa	Negativa
45	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativa
46	Negativa	Negativa
47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativa

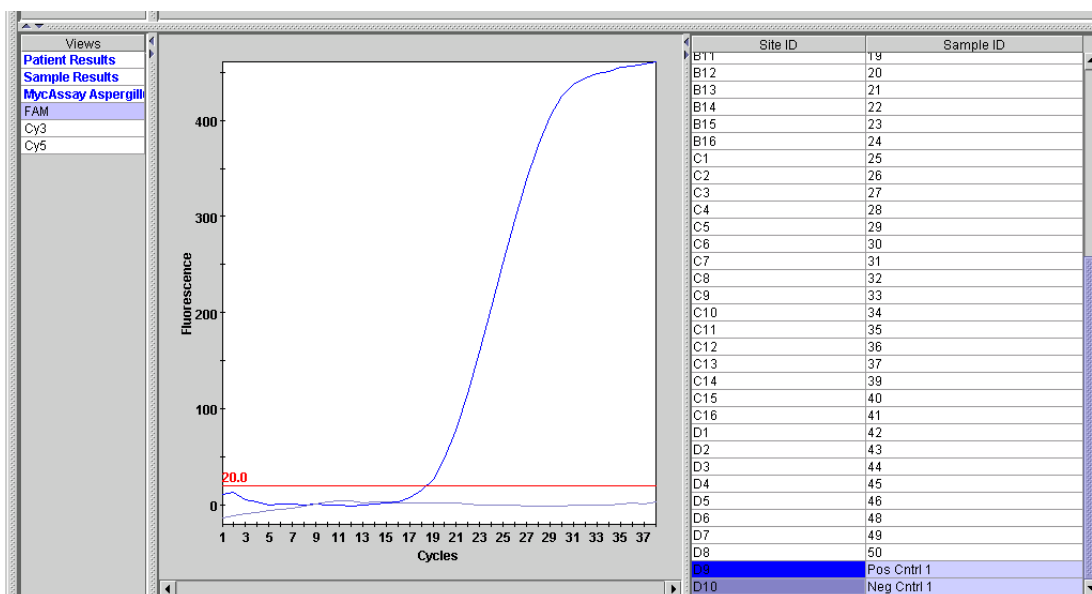
Tabela 6. Resultados da pesquisa de antígeno galactomanana e PCR

Paciente	GM 1	GM2	PCR 1	PCR Ct	CAI	Quantity	PCR 2	PCR Ct	CAI	Interpretação (PCR)
1	0,18	0,4	Negativo	37,4	ok	< 10	Negativo	0	31,9	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
2	0,42	4,4	Positivo	32,23	ok	86,2	Positivo	36,3	32,1	Presença de DNA de Aspergillus (PCR1,PCR2)
3	0,16	0,4	Negativo	38,66	ok	< 10	Negativo	0	32,9	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
4	0,22	0,6	Negativo	37,51	ok	< 10	Negativo	0	32,2	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
5	0,59	1,3	Negativo	38,74	ok	< 10	Negativo	0	33	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
6	0,31	2,2	Negativo	36,61	ok	< 10	Negativo	0	31,8	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
7	0,27	1,2	Negativo	37,68	ok	< 10	Positivo	37,5	32,9	Presença de DNA de Aspergillus (PCR2)
8	0,36	0,5	Negativo	38,96	ok	< 10	Negativo	0	32,8	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
9	0,38	1,2	Negativo	36,97	ok	< 10	Positivo	37,7	33,6	Presença de DNA de Aspergillus (PCR2)
10	0,45	0,7	Negativo	38,01	ok	< 10	Negativo	0	33	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
11	0,28	3,1	Negativo	37,92	ok	< 10	Negativo	0	33	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
12	0,33	1,5	Negativo	45	ok	< 10	Negativo	0	33,4	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
13	0,27	1,5	Negativo	38,52	ok	< 10	Negativo	0	32,9	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
14	0,26	0,3	Negativo	39,72	ok	< 10	Positivo	35,6	32,4	Presença de DNA de Aspergillus (PCR2)
15	0,19	1,3	Negativo	45	ok	< 10	Negativo	0	32,6	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
16	0,18	0,6	Negativo	39,46	ok	< 10	Negativo	0	31,3	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
17	0,23	0,5	Negativo	38,51	ok	< 10	Negativo	0	30,6	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
18	0,14	0,2	Negativo	37,59	ok	< 10	Negativo	0	32,3	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
19	0,40	0,9	Negativo	38,08	ok	< 10	Negativo	0	32,3	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
20	0,18	0,6	Negativo	38,82	ok	< 10	Negativo	0	32,4	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
21	0,38	0,8	Negativo	39,10	ok	< 10	Negativo	0	30,7	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
22	0,13	0,3	Negativo	37,55	ok	< 10	Negativo	0	33,1	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
23	0,51	1,2	Negativo	37,42	ok	< 10	Inconclusivo	0	0	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1)
24	0,26	0,7	Negativo	38,43	ok	< 10	Negativo	0	31,8	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
25	0,57	3,1	Negativo	38,27	ok	< 10	Negativo	0	32,2	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
26	0,18	0,5	Negativo	38,54	ok	< 10	Negativo	0	32,4	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
27	0,10	0,2	Negativo	36,36	ok	< 10	Negativo	0	31,8	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
28	0,20	0,4	Negativo	37,3	ok	< 10	Positivo	33,9	32,8	Presença de DNA Aspergillus (PCR2)
29	0,32	0,4	Negativo	38,35	ok	< 10	Negativo	0	31,6	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
30	0,18	0,7	Negativo	37,83	ok	< 10	Positivo	36,2	31,2	Presença de DNA Aspergillus (PCR2)
31	0,21	1,1	Negativo	37,87	ok	< 10	Inconclusivo	0	0	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1)
32	0,29	2,2	Negativo	37,56	ok	< 10	Negativo	0	31,4	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
33	0,32	1,4	Negativo	38,67	ok	< 10	Negativo	0	33,1	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
34	0,42	4,0	Negativo	37,87	ok	< 10	Negativo	0	32,1	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
35	0,28	0,5	Negativo	37,56	ok	< 10	Negativo	0	32,4	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
36	0,44	0,7	Negativo	38,67	ok	< 10	Negativo	0	33,3	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
37	0,41	2,1	Negativo	35,71	ok	< 10	Positivo	37,8	14,5	Presença de DNA Aspergillus (PCR2)
38	0,30	0,7	Negativo	38,25	ok	< 10	Negativo	0	32,7	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
39	0,19	0,3	Negativo	45	ok	< 10	Positivo	37,3	33	Presença de DNA Aspergillus (2)
40	0,32	1,1	Negativo	37,64	ok	< 10	Negativo	0	32,1	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
41	0,41	0,8	Negativo	38,87	ok	< 10	Negativo	0	32,7	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
42	0,21	0,8	Negativo	40,55	ok	< 10	Positivo	35,2	32,1	Presença de DNA Aspergillus (PCR2)
43	0,24	5,2	Negativo	36,63	ok	< 10	Negativo	0	32,2	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
44	0,22	1,3	Negativo	41,36	ok	< 10	Negativo	0	32,1	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
45	0,20	0,4	Negativo	37,40	ok	< 10	Negativo	0	32,5	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
46	0,28	0,7	Negativo	45	ok	< 10	Positivo	35,0	30,8	Presença de DNA Aspergillus (PCR2)
47	0,32	0,8	Negativo	35,5	ok	< 10	Negativo	0	34,7	Ausência de DNA de Aspergillus (PCR1, PCR2)
Controle	ok	ok	Cont -	ok	ok	< 10	Cont -	0	32,6	Ausência de DNA de Aspergillus
Controle	ok	ok	Cont +	ok	ok	< 10	Cont +	18,4	32,4	Presença de DNA de Aspergillus

CAI: Controle de amplificação interno; GM1; galactomanana no soro; GM2: galactomanana respiratória; PCR Ct: Cycle threshold; PCR1: Nanogen; PCR2 :Myconostica.

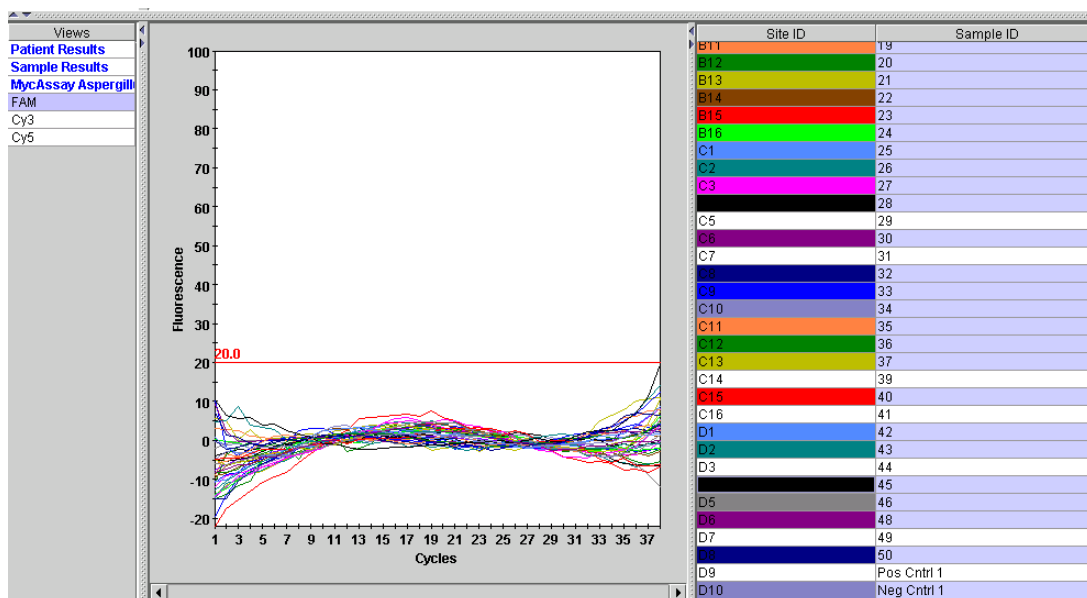
Gráficos de amplificação do DNA com MycAssay™ Aspergillus (Myconostica)

Controle negativo e positivo



Fonte: Dra. Caroline B. Moore

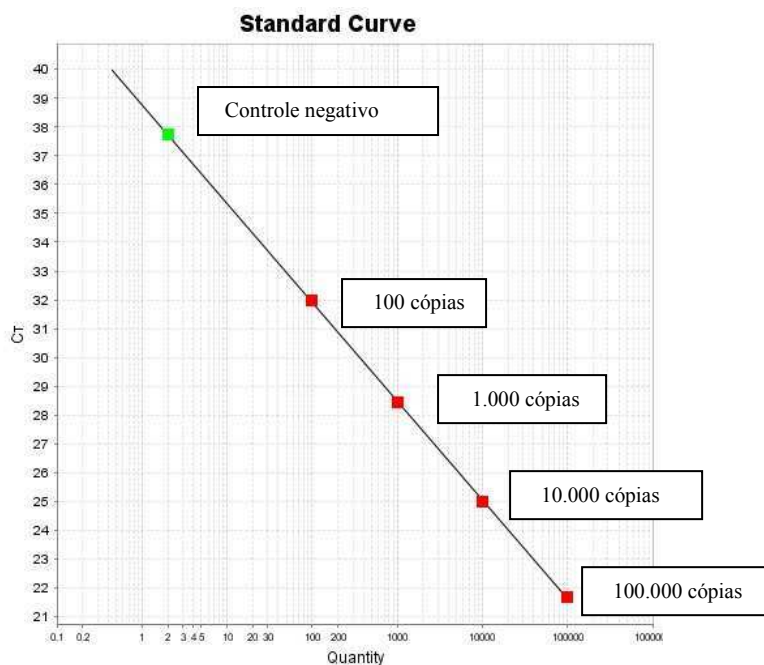
Amostras negativas



Fonte: Dra. Caroline B. Moore

Gráficos de amplificação do DNA com *Aspergillus* spp q-PCR Alert kit (Nanogen)

Controle Negativo e Curva Padrão



Curva Padrão e amostras negativas

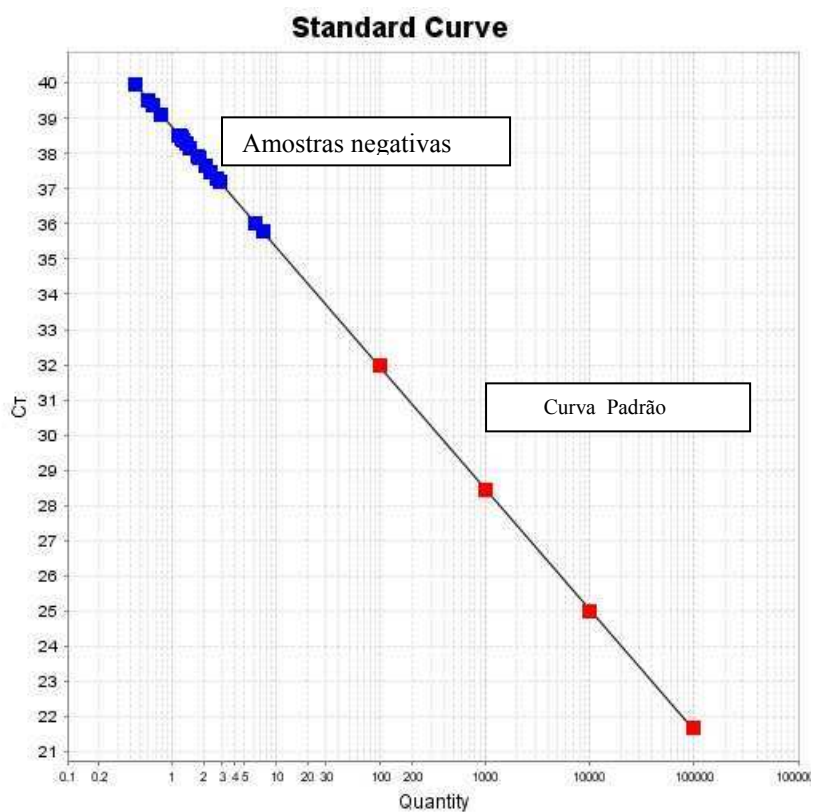


Tabela 7. Dados demográficos e de desfecho

Paciente	Internação	UTI	VM antes	VM pós	UTI pós	Desfecho	Óbito
1	22	22	3	15	15	15	Sim
2	11	9	5	1	1	1	Sim
3	29	1	1	26	27	27	Sim
4	14	6	4	2	2	10	Não
5	15	8	7	3	3	7	Não
6	20	16	4	5	5	5	Sim
7	28	6	3	3	16	29	Não
8	109	22	7	13	15	96	Não
9	51	5	11	24	40	41	Não
10	12	1	3	4	39	40	Não
11	115	2	1	48	48	115	Não
12	43	15	6	21	21	21	Sim
13	26	13	11	6	37	24	Sim
14	27	24	4	23	13	23	Sim
15	19	2	9	16	16	16	Sim
16	27	27	5	13	13	13	Sim
17	21	4	2	4	4	4	Sim
18	34	13	7	5	10	19	Não
19	57	5	5	19		52	Não
20	25	19	3	11	19	11	Sim
21	15	6	6	2	2	2	Sim
22	8	4	3	2	6	19	Não
23	21	2	2	4	5	9	Não
24	39	20	11	18	13	36	Não
25	61	7	3	16	17	50	Não
26	35	10	5	8	8	30	Não
27	44	13	16	28	28	28	Sim
28	16	6	6	1	6	10	Não
29	29	22	1	21	21	21	Sim
30	74	24	3	9	20	68	Não
31	32	32	1	30	31	31	Sim
32	4	1	1	1	2	2	Não
33	37	11	4	8	8	8	Sim
34	38	14	4	3	10	30	Sim
35	14	13	4	7	7	7	Sim
36	31	4	3	14	12	25	Não
37	25	25	2	23	20	20	Sim
38	19	6	6	6	6	6	Sim
39	40	31	3	3	3	3	Sim
40	31	10	11	19	27	41	Não
41	71	14	14	15	27	53	Não
42	5	1	3	2	3	3	Sim
43	66	13	7	28	27	55	Não
44	28	10	3	7		22	Não
45	50	30	31	16	16	16	Sim
46	17	12	12	3	4	4	Sim
47	38	6	6	11	6	11	Sim

Legenda : Internação: dias de internação antes da entrada no estudo; UTI: dias de internação na UTI, antes da entrada no estudo; VM antes: dias de ventilação mecânica antes da entrada no estudo; VM pós: dias de ventilação mecânica depois da entrada no estudo; UTI pós: dias de UTI depois da entrada no estudo; Desfecho: dias para o desfecho (alta ou óbito).