



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

PESQUISA DO ANTIGÉNIO *GALACTOMANNAN* EM LAVADOS
BRONCOALVEOLARES NA DETECÇÃO PRECOCE DE ASPERGILOSE
INVASIVA EM DOENTES IMUNODEPRIMIDOS

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

Por

Margarida de Sousa Monteiro da Rocha

Outubro, 2011



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

PESQUISA DO ANTIGÉNIO *GALACTOMANNAN* EM LAVADOS
BRONCOALVEOLARES NA DETECÇÃO PRECOCE DE ASPERGILOSE
INVASIVA EM DOENTES IMUNODEPRIMIDOS

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

Por

Margarida de Sousa Monteiro da Rocha

sob orientação de

Dr^a Catarina Lameiras e Prof. Doutora Manuela Pintado

Outubro, 2011

Resumo

Doentes oncológicos submetidos a tratamentos imunossupressores têm um elevado risco para adquirirem infecções oportunistas como a Aspergilose Invasiva (AI).

No diagnóstico da infecção primária pulmonar, a aspergilose apresenta quadros clínicos de infecção inespecíficos e os métodos de diagnóstico convencionais para além de serem morosos, têm pouca sensibilidade e especificidade. Novas estratégias de diagnóstico têm sido avaliadas nomeadamente a pesquisa do antígeno *galactomannan* (GM) por ELISA.

Os objectivos deste trabalho foram validar o teste de diagnóstico de GM na Aspergilose Pulmonar Invasiva (API) e determinar o melhor *cut-off* de GM para validar este marcador no diagnóstico precoce de API numa amostra de doentes oncológicos.

Um estudo de coorte prospectivo foi realizado em amostras brônquicas (LB/ LBA) de 104 doentes com suspeita de aspergilose pulmonar, durante um período de dezanove meses no Serviço de Microbiologia do IPOFG do Porto. Os doentes foram definidos com API (provável e provada) ou sem API, segundo as definições revistas pela EORTC/MSG. Como grupo controlo (n=41) foram estudadas amostras brônquicas de doentes sem evidência de infecção respiratória. Foram avaliadas as variáveis da cultura, ADN e citologia para *Aspergillus*, como variáveis clínicas, TAC e factores de risco do doente, e antibioterapia. Dos 104 doentes estudados com suspeita de aspergilose pulmonar, em 13 casos foi diagnosticado API (12,5%) destes 54% dos casos tinham doença hematológica (n=7/13). Todos apresentavam GM positivo, 46% cultura positiva para *Aspergillus*, 62% com ADN positivo e 46% com citologia positiva. Em 62% dos casos estavam submetidos a terapêuticas antifúngicas. Para um *cut-off* $GM \geq 1$, a sensibilidade do teste do GM para diagnóstico de API (provável ou provada) foi de 100% e a especificidade de 45% com IC95% [0,35-0,55]. O valor preditivo positivo para o teste de GM foi de 24% e o valor preditivo negativo foi de 93%. A determinação do valor preditivo pela curva de ROC nesta amostra foi de 0.8, para $GM \geq 1,3$ o teste teve uma sensibilidade de 85%, e uma especificidade de 65%, maior do que aquela encontrada para um *cut-off* ≥ 1 . O teste de diagnóstico GM em LBA é útil para o diagnóstico da API. No entanto, este marcador deve ser associado com outros, parâmetros clínicos e laboratoriais, tendo o seu real valor um elevado valor preditivo negativo para esta infecção. De realçar a possibilidade de existência de falso-positivos pela interferência com o tratamento de certos antibióticos.

Abstract

Oncological patients undergoing immunosuppressive treatments have a higher risk for acquiring opportunistic infections such as invasive aspergillosis (IA).

In the diagnosis of primary pulmonary infection, aspergillosis shows nonspecific clinical signs of infection, therefore conventional methods of diagnosis, have poor sensitivity and specificity. New diagnostic strategies such as the detection of *galactomannan* antigen (GM) by ELISA.

The aim of this study was to validate the GM test in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (API) and determine the best *cut-off* of GM to validate this marker in early diagnosis of API in samples of oncological patients.

A prospective cohort study was conducted in bronchial samples (LB/LBA) of 104 patients with suspected pulmonary aspergillosis, during a period of nineteen months in the Department of Microbiology, Porto IPOFG. Patients were defined with API (probable and proven) or without API, according to the revised definitions for the EORTC/ MSG. As a control group (n=41) bronchial samples from patients without evidence of respiratory infection were studied. We evaluated the variables of culture, DNA and cytology for *Aspergillus*, as clinical variables, such as CT scan and the patient's risk factors, and antibiotic therapy. Of the 104 patients studied with suspected pulmonary aspergillosis, 13 cases were diagnosed with API (12,5%), and of this, 54% of cases had hematologic disease (n=7/ 13). All had GM positive, 46% positive culture for *Aspergillus*, 62% with positive DNA, and 46% with positive cytology. In 62% of the cases were submitted to antifungal therapies. For a *cut-off* GM ≥ 1 , sensitivity of the GM test to diagnose API (probable or proven) was 100% and specificity was 45% with IC95% [0,35 to 0,55]. The positive predictive value for the GM test was 24% and negative predictive value was 93%. The predictive value for the ROC curve in this sample was 0,8 to GM $\geq 1,3$; the GM test had a sensitivity of 85% and a specificity of 65%, higher than that found for a *cut-off* ≥ 1 . The diagnostic GM test in BAL is useful for the diagnosis of IPA. However, this marker must be associated with others parameters, clinical and laboratory, and its real value has a higher negative predictive value for this infection. To enhance the possibility of false-positive by interference with the treatment of certain antibiotics.

Agradecimentos

Desejo agradecer a todas as pessoas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização desta Tese de Mestrado,

Em primeiro lugar, à minha orientadora Dr^a Catarina Lameiras, com quem muito aprendi em todo o processo de orientação científica desta dissertação, um agradecimento sincero pela sua orientação, pela grande oportunidade, pela amizade, pelo apoio e pela constante disponibilidade.

À minha orientadora, Professora Doutora Manuela Pintado, pela discussão de ideias, pela sua orientação e pelos seus conselhos.

À Dr^a Maria Augusta Guimarães, médica patologista, directora do Serviço de Microbiologia do Instituto Português de Oncologia do Porto, pela confiança depositada, pela sua presença, acompanhamento, questionamento, incentivo, olhar crítico, e por todo o apoio que me prestou.

À Dr^a Rosa Teresa, um grande obrigada pela motivação, incentivo e optimismo que sempre me transmitiu.

À Dr^a Paula, o meu agradecimento, pois não me esqueço o apoio que me deu na integração no Serviço de Microbiologia do Instituto Português de Oncologia do Porto.

À Pfizer Portugal, um muito obrigado, por ter patrocinado os kits Platelia®*Aspergillus*, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À comissão de fomento da investigação em cuidados de saúde, por ter financiado este projecto (CFIS N^o 27/2007), um muito obrigado.

À Dr^a Sandra Saleiro e Dr Luís Rocha, do Serviço de Pneumologia do Instituto Português de Oncologia do Porto, por terem fornecido os lavados broncoalveolares e brônquicos, sem os quais este trabalho não seria possível.

A todos os funcionários do laboratório de Microbiologia do Instituto Português de Oncologia do Porto, que com carinho e amizade permitiram a minha integração na equipa e me ajudaram durante este período.

Aos amigos do laboratório, Joana Ribeiro, Sandra Almeida, Ana Rita Brandão, Rui Ribeiro, Hugo Sousa, obrigado por proporcionarem um óptimo convívio, pela força, pela amizade sincera, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por estarem, sempre presentes, pela coragem que sempre me transmitiram, pelo carinho e amor que sempre me dedicaram, o meu profundo obrigado.

Ao meu irmão, Diogo, um exemplo de luta e coragem, o meu obrigada, pelo apoio e incentivo que sempre me prestou, mesmo à distância, e por estar sempre a torcer por mim.

Por fim, mas definitivamente não o último, ao meu namorado, Luís, agradeço com um carinho muito especial, pela presença constante na minha vida, pela partilha, constante motivação, incentivo e força, pela compreensão e paciência que foram fundamentais.

Índice

Resumo	iii
Abstract	v
Agradecimentos	vii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiv
1 Introdução	1
1.1 <i>Aspergillus</i>	1
1.2 Aspergilose	1
1.2.1 Manifestações clínicas e Patogénese.....	2
1.2.2 Factores de risco	4
1.3 Diagnóstico da aspergilose invasiva	5
1.3.1 Diagnóstico clínico e radiológico.....	6
1.3.2 Diagnóstico laboratorial	7
1.3.2.1 Diagnóstico micológico	7
1.3.2.2 Diagnóstico não cultural.....	8
1.3.2.2.1 Diagnóstico serológico	8
1.3.2.2.1.1 Detecção do antígeno <i>galactomannan</i>	9
1.3.2.2.2 Diagnóstico histopatológico e citológico	13
1.3.2.2.3 Diagnóstico molecular.....	14
1.3.3 Critérios para definições de Aspergilose Invasiva	15
1.4 Terapêutica.....	17
2 Objectivos	19
3 Material e métodos	20
3.1 Amostra estudada	20
3.2 Exame micológico.....	20
3.3. Critérios avaliados e estudados no diagnóstico de API.....	20
3.4 Detecção do antígeno <i>Galactomannan</i>	20
3.4.1 Processamento das amostras	21
3.4.2 Reacção Imuno-Enzimática	21
3.4.3 Detecção e leitura de GM	22
3.4.4 Interpretação dos resultados	22
3.5 Detecção do ADN de <i>Aspergillus spp</i> por PCR.....	22
3.6 Análise estatística	23

4 Resultados	24
Discussão	29
6 Conclusões	32
Trabalho futuro	32
8 Referências bibliográficas	33

Lista de figuras

- Figura 1.1:** Morfologia celular da espécie de *Aspergillus* durante o crescimento ambiental e in vivo. Conídios, fonte de infecção, são aerolizados pelo crescimento aéreo das hifas no meio ambiente. Organismos adquiridos através do tracto respiratório germinam em formas filamentosas..... **3**
- Figura 1.2:** Diagrama do espectro de doenças do pulmão causadas por *Aspergillus spp*.....**4**
- Figura 1.3:** Parede celular fúngica do *Aspergillus spp*..... **10**
- Figura 1.4:** Princípio do teste Platelia®*Aspergillus* EIA (BioRad) para a detecção do galactomannan em amostras clínicas..... **11**
- Figura 1.5:** Aparência do *Aspergillus spp* em cortes histológicos..... **13**
- Figura 4.6:** Curva de ROC para valores de GM observados nos 13 casos com API.... **29**

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Critérios da EORTC/MSG para diagnóstico de AI (Adaptado de De Pauw et al., 2008).....	16
Tabela 4.2: Características clínicas dos doentes estudados com suspeita API (n=104).	24
Tabela 4.3: Resultados dos parâmetros laboratoriais estudados em relação ao diagnóstico de API.....	25
Tabela 4.4: Análise da associação de GM e ADN de <i>Aspergillus spp</i> para a variável API.....	27
Tabela 4.5: Factores de risco para resultados de GM falso-positivos.....	28

Lista de abreviaturas

AI - Aspergilose Invasiva

API – Aspergilose Pulmonar Invasiva

IFI – Infecção Fúngica Invasiva

DFI – Doença Fúngica Invasiva

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

EORTC/MSG- *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group*

TAC - Tomografia Axial Computarizada

PAS – *Periodic Acid-Schiff*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

EIA - *Enzyme Immunoassay*

GM - *Galactomannan*

LB – Lavado Brônquico

LBA – Lavado Broncoalveolar

ITC - Itraconazole

VO - Voriconazole

POS - Posocanazole

CAS - Caspofunfina

AMB - Anfotericina B

IDSA - *Infectious Disease Society of America*

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

DO - Densidade Óptica

EBA – Anticorpo monoclonal de rato EBA-2

SNC – Sistema Nervoso Central

IPO – Instituto Português de Oncologia

QT – Quimioterapia

RT – Radioterapia

TMO- Transplante de medula óssea

ROC – *Receiving Operating Curve*

1 Introdução

1.1 *Aspergillus*

Fungos do género *Aspergillus* são oportunistas, filamentosos, ubíquos e saprofiticos (Sharma and Chwogule, 1998) que pertencem à família dos *Aspergillaceae* e à classe dos Ascomicetos (Sharma and Chwogule, 1998). O género de *Aspergillus*, que inclui quase 200 espécies, tem um impacto grande na saúde pública (Gugnani, 2003). Apesar dos *Aspergillus fumigatus* ser o agente etiológico mais comum, responsável por 90% das infecções humanas (Latgé, 1999), não é o único patogénico deste género. *A. flavus*, *A. terreus*, *A. níger* e *A. nidulans* também podem causar infecções em humanos (Denning, 1998). *Aspergillus fumigatus* apresentam mecanismos únicos de resistência ao stress, justificando a sua capacidade de adaptação ao crescimento em stress no hospedeiro (Bhabhra and Askew, 2005). Durante a replicação os *Aspergillus* libertam para o meio ambiente inúmeros esporos ou conídias, que medem cerca de 3 a 5µm. Estes esporos são constantemente inalados, directamente do ar ou de colonização da nasofaringe, pelos seres humanos (Chen *et al.*, 2001). São fungos normalmente presentes no solo, plantas, alimentos (Chen *et al.*, 2001). As obras em edifícios aumentam consideravelmente a quantidade de *Aspergillus* no ar, e várias epidemias de aspergilose pulmonar em hospitais têm sido descritas em períodos de construção (Latgé, 1999).

1.2 Aspergilose

A aspergilose é um exemplo de micose oportunista que constitui um grave problema em doentes imunodeprimidos, sendo responsável por elevada morbidade e mortalidade. Estima-se que a taxa de incidência e de mortalidade da Aspergilose Invasiva (AI) entre os diferentes doentes de risco. Warnock *et al.*, em 2001 reuniu alguns estudos epidemiológicos, estimando que a incidência de AI é entre 5 a 25% em doentes com leucemia aguda, 0,5 a 25% em doentes receptores autólogos de transplante de células hematopoiéticas e 6% em receptores de transplante do pulmão. Pagano *et al.*, 2006, realizou um estudo de coorte, retrospectivo, durante 4 anos, onde refere que a incidência de AI na Europa é de 7%, sendo que apesar da incidência de AI divergir consoante o grupo de risco, a taxa de mortalidade desta doença é alta (38 a 85%). Neste mesmo estudo, que incluiu enfermarias em Itália, o autor refere que a taxa de mortalidade da AI

é de aproximadamente 38% em doentes com leucemia mielóide aguda, 50 a 60% em receptores de transplantes de órgãos e 70 a 85% em outros doentes imunodeprimidos.

1.2.1 Manifestações clínicas e Patogénese

Em hospedeiros imunocomprometidos, o *Aspergillus spp* representa a maior causa de morbidade e mortalidade (Denning, 1998).

Os conídios, que têm um diâmetro de 2 a 3 μ m e encontram-se aerolizados, representam o mecanismo pelo qual estes organismos se espalham no ambiente e causam infecção pulmonar após a sua inalação (Figura 1.1) (Marr *et al.*, 2002).

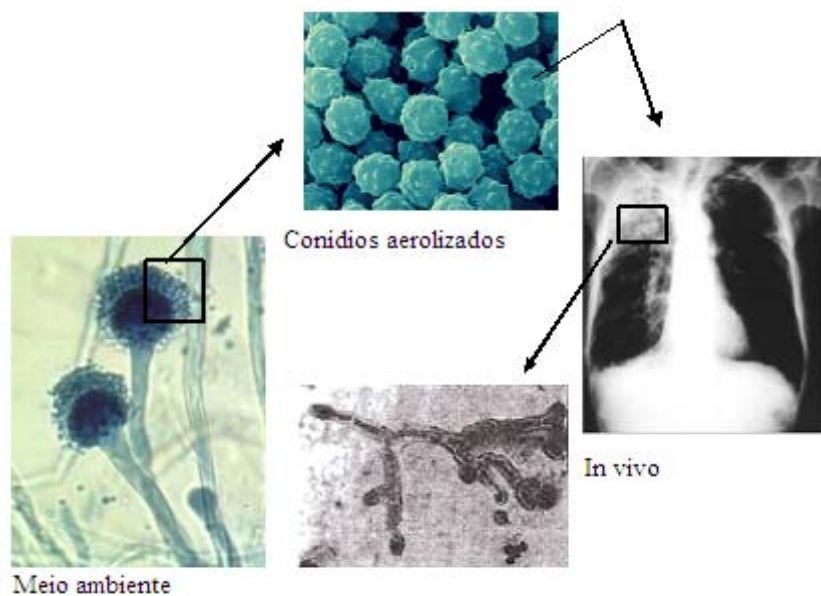


Figura 1.1: Morfologia celular da espécie de *Aspergillus* durante o crescimento ambiental e *in vivo*. Conídios, fonte de infecção, são aerolizados pelo crescimento aéreo das hifas no meio ambiente. Organismos adquiridos através do tracto respiratório germinam em formas filamentosas (adaptado de Marr *et al.*, 2002).

Os *Aspergillus spp* são responsáveis por uma variedade de patologias pulmonares. Estas variam com gravidade do crescimento comensal nas vias aéreas e invasão do pulmão e seus vasos sanguíneos, levando à sepsis e à morte (Figura 1.2). (Kradin and Mark, 2007).

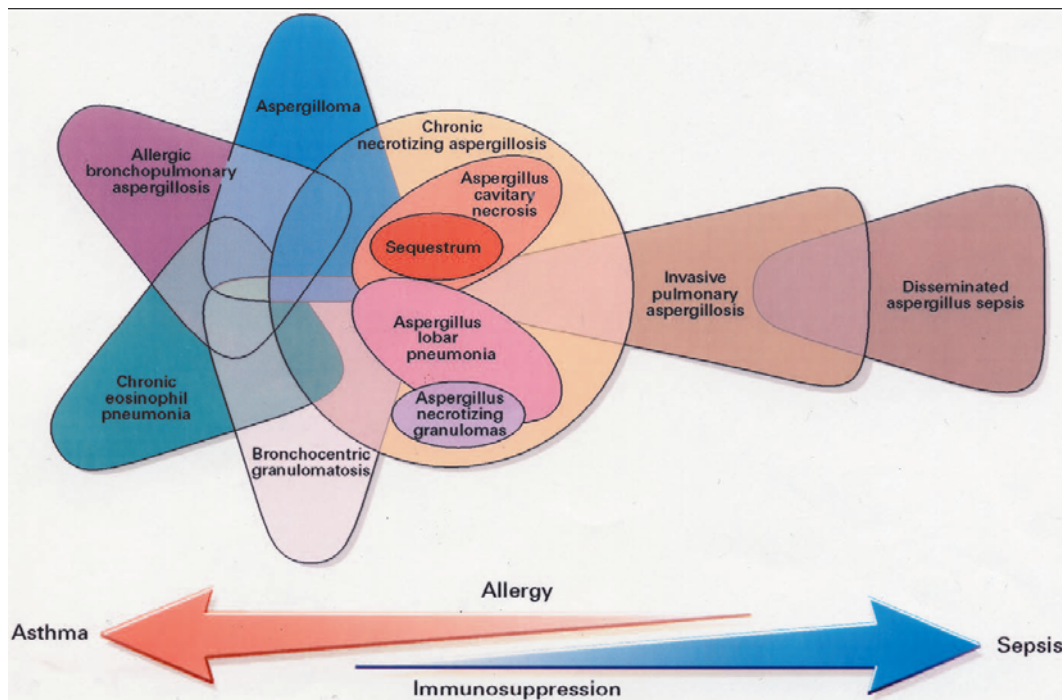


Figura 1.2: Diagrama do espectro de doenças do pulmão causadas por *Aspergillus spp* (Kradin and Mark, 2007)

As doenças invasivas incluem principalmente infecções do tracto respiratório inferior. Se o sistema imunitário do doente estiver enfraquecido, os conídios inalados irão germinar e produzir hifas que por sua vez, irão invadir os tecidos circundantes, levando ao desenvolvimento da doença. O sistema nervoso central (SNC), o sistema cardiovascular e outros tecidos podem ser infectados como resultado da disseminação hematogénica ou da extensão directa dum foco de infecção contíguo (Hope *et al.*, 2005a; Barnes and Marr, 2006). O envolvimento do SNC é uma consequência da aspergilose disseminada, podendo manifestar-se por convulsões ou ainda por sinais neurológicos focais (Horii and Nopper, 2007; Singer *et al.*, 1998). As infecções crónicas, que incluem otomicoses (infecção fúngica do conduto auditivo externo) e aspergiloma pulmonar, caracterizam-se pelo crescimento crónico de *Aspergillus* em espaços pré-formados e mal irrigados e não costumam ser invasivas porque muitas vezes as lesões provocadas são necrotizantes acabando por impermeabilizar a passagem do fungo do tecido pulmonar. A variedade de manifestações clínicas provocadas pelos *Aspergillus* é bastante heterogénea. (Latge, 1999; Stevens *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2005a; Barnes and Marr, 2006).

Vários factores parecem contribuir para a patogenicidade dos *A. fumigatus*. Este, é um organismo particularmente termotolerante: a sua temperatura óptima centra-se

habitualmente entre 37°C e 42°C, mas pode crescer a temperaturas até 55°C, e assim aproxima-se do limite da temperatura superior dos organismos eucariotas. Isto sugere que o *A. fumigatus* envolve mecanismos distintos de resistência térmica, mudanças de pH e stress oxidativo, o que poderá fornecer-lhe a base da sua virulência (Chang *et al.*, 2004).

Quando a função dos macrófagos alveolares está comprometida, os conídios inalados não são fagocitados nem destruídos pelos alvéolos e proliferam, dando origem a hifas. As hifas podem causar invasão tecidular, especialmente se a acção dos neutrófilos também estiver comprometida. O número de esporos inalados também pode ser um dos factores de patogenicidade (Latgé, 1999).

Vários estudos mostraram ainda que o uso de corticosteróides limita a capacidade funcional dos fagócitos para erradicar os conídios e as hifas de *A. fumigatus* (Bummer *et al.*, 2001; Kamberi *et al.*, 2002).

Vários potenciais factores de virulência do *A. fumigatus* têm sido identificados, incluindo várias proteases, fosfolipases, hemolisina, gliotoxina e muitas outras enzimas e toxinas (Latgé, 1999; Denning, 1998). A gliotoxina tem sido a estudada mais intensivamente. Esta toxina inibe a fagocitose dos macrófagos para promover a sua apoptose, e para bloquear a activação das células B e T (Latgé, 1999).

O período de incubação entre a exposição ao *Aspergillus* e ao desenvolvimento da doença não é ainda conhecido, no entanto este depende sempre do *status* imunológico do hospedeiro (Gerson *et al.*, 1984).

1.2.2 Factores de risco

A neutropenia prolongada e profunda, definida como uma contagem de neutrófilos menor a 500 por mm³ durante um período superior a 10 dias é um factor de risco na AI (Muhlemann *et al.*, 2005; Gerson *et al.*, 1984).

Doentes submetidos a uma intensa quimioterapia em doença hematológica, submetidos a transplante de células hematopoiéticas são os mais frequentemente afectados (Cornet *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2000a).

Doentes que passaram por períodos consecutivos de neutropenia profunda, para indução da remissão, consolidação ou tratamento de recaída, têm um risco aumentado para adquirirem AI (Walsh *et al.*, 1994; Martino *et al.*, 1997). No entanto, a administração

prolongada de ganciclovir na profilaxia do citomegalovírus, nestes doentes, também resulta num aumento do risco para a AI (Einsele *et al.*, 2000).

Em receptores de transplantes alogénicos de células hematopoiéticas ocorrem principalmente três períodos de risco: período neutropénico seguido de um regime de condicional; doença do enxerto contra o hospedeiro; e crónica doença do enxerto contra o hospedeiro (100 dias depois do transplante) (Marty and Rubin, 2006). A doença fúngica invasiva (DFI) é mais comum durante a terapêutica intensiva imunossupressora para a doença do enxerto contra o hospedeiro do que durante a neutropenia (Bhatti *et al.*, 2006; Wald *et al.*, 1997).

Doentes submetidos a transplantes de órgãos sólidos estão também sujeitos a maior risco de AI, particularmente aqueles submetidos a transplante do pulmão. A razão para isto inclui a colonização prévia com *Aspergillus* no pulmão nativo ou transplantado, uma redução na capacidade de depuração ciliar, e a exposição contínua ao ambiente do tecido transplantado (Patterson and Singh, 1999).

A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) avançada está correlacionada com maior risco de aspergilose invasiva pulmonar (API) (Ader, 2010). O uso prolongado de corticosteróides, que são muitas das vezes usados por doentes com DPOC está também associado ao maior risco de AI (Gao *et al.*, 2010; Guinea *et al.*, 2009).

1.3 Diagnóstico da aspergilose invasiva

As dificuldades associadas com o diagnóstico precoce e específico de AI continuam a ser uma grande barreira para uma estratégia eficaz da infecção oportunista (Wiederhold *et al.*, 2003)

No diagnóstico das infecções fúngicas invasivas (IFI) para além dos sinais serem inespecíficos, os métodos de diagnóstico convencionais *gold standard* apresentam morosidade e pouca sensibilidade. Um teste de diagnóstico laboratorial ideal para as IFI deverá ter uma alta sensibilidade e especificidade. O diagnóstico definitivo de AI baseia-se na combinação dos critérios clínicos e achados laboratoriais (Barnes and A. Marr, 2007).

A melhoria da capacidade de avaliação e diagnóstico precoce de AI, tornou-se mais que necessária, pois o diagnóstico precoce está associado com uma melhoria da sobrevivência dos doentes críticos, através de um início rápido da terapêutica antifúngica (Hope, *et al.*, 2005b).

1.3.1 Diagnóstico clínico e radiológico

O diagnóstico de AI é difícil. Os sintomas e sinais clínicos são inespecíficos. Estes aparecem já num estado tardio da infecção, o que leva ao aumento da importância do diagnóstico precoce. A maioria dos doentes apresenta febre persistente, apesar da administração dos antibióticos de largo espectro, excepto nos doentes tratados com corticosteróides, e é este normalmente o primeiro sinal para todas as infecções em doentes imunodeprimidos (Herbrecht *et al.*, 2004). Dor no peito durante a respiração, tosse, dispneia, produção de expectoração, estão presentes em aproximadamente 20% dos casos de API (Reichenberg *et al.*, 1998).

Assim, tanto na prática clínica como na investigação, existem diferentes níveis de certeza sobre o diagnóstico de AI (Sherif ang Segal, 2010). Em doentes neutropénicos, a febre persistente pode ser o único sinal de DFI (Sherif ang Segal, 2010).

A radiografia é pouco sensível e inespecífica para o diagnóstico de API. Em estudos precoces podem apresentar infiltrados não específicos ou lesões nodulares e o sinal do halo (sinal precoce e transiente durante o curso de API, resultante da necrose hemorrágica, à volta da lesão provocada pelo fungo ou das lesões da pleura) não é detectável. Só num estado mais tardio da doença é que se torna visível em radiografias simples o sinal crescente do ar e a cavitação (Blum *et al.*, 1994; Pasmans *et al.*, 1992). O sinal crescente do ar indica necrose central de uma lesão nodular. É definido como um crescente de ar dentro de um nódulo, e usualmente ocorre mais tarde no percurso da doença (Herbrecht *et al.*, 2004).

A tomografia axial computadorizada (TAC) do tórax tornou-se a técnica de imagem *gold standard* na AI, podendo detectar o envolvimento do pulmão num estado precoce da infecção (Del Bono *et al.*, 2008).

A TAC para além de ser mais sensível deve ser sempre realizada em doentes com neutropenia prolongada e com febre persistente ou recorrente com causa desconhecida e que não apresenta resposta a agentes antibacterianos, nomeadamente em doentes com leucemias (Greene *et al.*, 2007). Num estado precoce da doença, a TAC pode revelar sinais específicos de uma infecção, assim como o sinal do halo (Latgé, 1999). que é observado em fases precoces de AI broncopulmonar (Stevens *et al.*, 2000; Hussel *et al.*, 1999).

Vários estudos têm vindo a confirmar que a TAC realizada precocemente e periodicamente em doentes com neutropenia febril reduz a mortalidade devido à AI, se a terapêutica tiver sido começada ao primeiro sinal de infecção pulmonar fúngica (Caillot *et al.*, 1997).

1.3.2 Diagnóstico laboratorial

1.3.2.1 Diagnóstico micológico

O exame microscópico directo das amostras clínicas deve ser o procedimento de primeira linha sempre que os fungos são o possível agente etiológico, no entanto estes apresentam baixa sensibilidade (Hope *et al.*, 2005b). O exame directo com hidróxido de potássio, calcoflúor e Gram permitem um diagnóstico presuntivo mais rápido. O hidróxido de potássio permite a visualização das hifas através da digestão parcial do material proteico, deixando a parede celular intacta (Ruchel and Schaffrinski, 1999; Chander *et al.*, 1993). A coloração de Gram deve ser feita como rotina. O Calcoflúor é um corante de fluorescência solúvel na água e que se liga selectivamente à ligação β -glicosídica de polissacarídeos dentro da parede celular dos fungos. Com esta coloração os elementos fúngicos coram e ficam bem delineados podendo assim ser facilmente identificados. A confiança, simplicidade e rapidez do método, torna-o adequado para o seu uso no diagnóstico de rotina em relação aos outros (Andreas *et al.*, 2000).

O isolamento de espécies de *Aspergillus* a partir de amostras do trato respiratório inferior apresentam uma baixa sensibilidade das culturas (<30%) para o diagnóstico de AI em doentes imunocomprometidos (Chamilos and Kontoyiannis, 2006).

Aspergillus spp não é exigente nutricionalmente e é termotolerante, apresentando um crescimento rápido a temperaturas superiores a 37°C e formando colónias verde-azuladas ou verde-aczentadas em meios de cultura selectivos para fungos ou em meios comumente usados para o isolamento bacteriano, devendo-se ter em conta que quando se suspeita de uma infecção por este género, não se deve utilizar meios de cultura com cicloheximida, uma vez que este inibe o seu crescimento (Pemán, 2000).

Um meio específico para fungos é o Saboraud Dextrose Agar (SAB). A adição de antibióticos como o clorofenicol e a gentamicina ao meio, é necessário para a recuperação de *Aspergillus spp* de amostras obtidas a partir de locais não estéreis, uma vez que estes não permitem o crescimento de bactérias (Hope *et al.*, 2005b).

Uma vez que as culturas apresentam uma baixa sensibilidade no diagnóstico de AI, o facto de aparecer uma única cultura positiva vai resultar num diagnóstico pouco provável. No entanto, o aparecimento de culturas de espécies de *Aspergillus* nem sempre significa infecção fúngica, uma vez que pode ocorrer a colonização em doentes imunocomprometidos (Alexander and Pfaller, 2006)

As maiores desvantagens dos meios de cultura, são o facto de estes serem relativamente morosos, com baixas sensibilidades e requerem um especialista na identificação do fungo ao nível da espécie (Hope et al., 2005b).

Todos os esforços têm vindo a ser feitos para identificação das espécies nas culturas micológicas de forma a conduzir uma terapêutica dirigida adequada, sendo este o critério microbiológico *gold standard* para o diagnóstico de AI (Balajee et al., 2006; Panackal et al., 2006).

1.3.2.2 Diagnóstico não cultural

1.3.2.2.1 Diagnóstico serológico

Vários testes para a detecção de antígeno e anticorpos têm sido aplicados para o diagnóstico de AI. Os testes indirectos de detecção de anticorpos têm uma sensibilidade entre os 17- 90% e podem ser úteis apenas na combinação com os testes de detecção de antígenos (Denning et al., 2003), no entanto, uma vez que estes doentes se encontram imunodeprimidos, apresentam um défice de anticorpos, o que leva a que este tipo de diagnóstico não seja útil para o diagnóstico de AI.

A detecção do antígeno pode ser feita tanto pelo método de detecção de *galactomannan* por ELISA *double sandwich* como pelo teste de detecção de 1,3-β-D-glucano (Yeo and Wong, 2002). O *galactomannan* é um constituinte da parede celular, e é libertado da célula de *Aspergillus* durante a fase de crescimento logarítmica *in vitro*, enquanto que o ADN (ácido desoxirribonucleico) apenas é libertado após a destruição do micélio (Mennink-Kersten et al., 2006). Entre os fungos clinicamente importantes, o *galactomannan* é encontrado predominantemente no género *Aspergillus* (Odabasi et al. 2006).

1.3.2.2.1.1 Detecção do antigénio *galactomannan*

O *galactomannan* é um polissacarídeo termoestável, componente da parede celular de fungos do género *Aspergillus*, composto por uma estrutura ramificada com uma cadeia linear de α -mannan e cadeias curtas de 1,5- β -galactofuranose (Klont *et al.*, 2004) (figura 1.3).

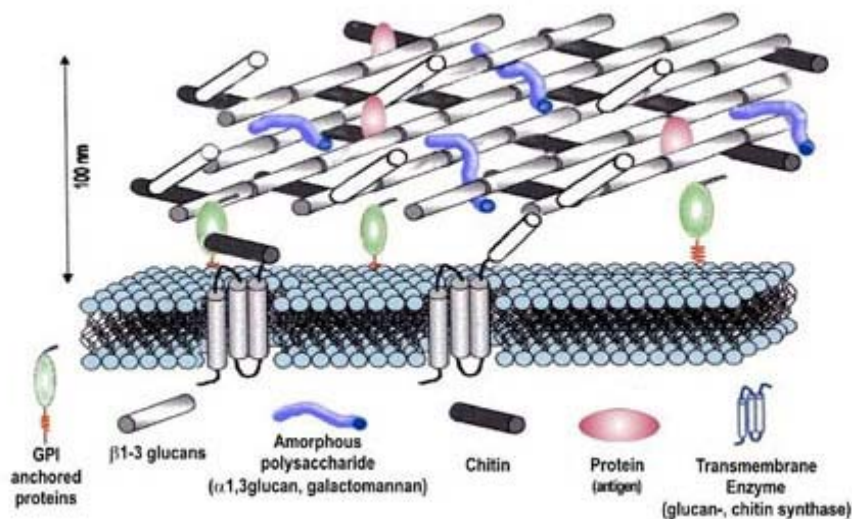


Figura 1.3: Parede celular fúngica do *Aspergillus spp* (Latgé *et al.*, 2003)

Os conídios de *Aspergillus spp* que são inalados do meio ambiente irão ser depositados no alvéolo dos pulmões. No hospedeiro, o conídio irá germinar e as hifas irão desenvolver-se e invadir o tecido pulmonar. Dependendo do estado imunitário do hospedeiro o crescimento dos fungos pode ficar restrito às vias aéreas, invadir a membrana basal, ou invadir os vasos sanguíneos, causando hemorragia e por último disseminação (Mennink- Kersten *et al.*, 2004). Não é claro como os antigénios são libertados pelos fungos para a circulação, mas duas das hipóteses descritas incluem: (i) os antigénios podem difundir-se livremente através do revestimento endotelial dos capilares pulmonares e (ii) o crescimento angioinvasivo dos *Aspergillus* é necessário para os antigénios serem depositados na corrente sanguínea. Dado o tamanho relativamente grande dos antigénios pode-se assumir que a angioinvasão é necessária para o antigénio ser depositado na circulação. Obviamente o grau de angioinvasão irá variar com a natureza da doença subjacente e com qualquer dano provocado por agentes tóxicos e irradiação (Mennink- Kersten *et al.*, 2004).

Este antígeno é, então, libertado na circulação sanguínea durante o crescimento das hifas nos tecidos do hospedeiro e, por ser hidrossolúvel, pode ser encontrado em diferentes amostras clínicas (Klont *et al.*, 2004).

Estudos *in vitro* revelaram que a quantidade de *galactomannan* libertado pode variar de acordo com a espécie de *Aspergillus* envolvida (Mennink-Kersten *et al.*, 2005; Swanink, *et al.*, 1997).

O método comercial Platelia® *Aspergillus* é uma técnica de “Enzyme Immunoassay” (EIA) está em uso na Europa desde os anos 90, e foi recentemente aprovado pela “Food and Drug Administration” nos Estados Unidos (Aquino *et al.*, 2007; Maertens *et al.*, 2007a e 2007b).

Platelia® *Aspergillus* é um kit comercial de ELISA *double sandwich* que fornece um resultado rápido e que usa o anticorpo monoclonal de rato EB-A2, que reconhece as cadeias laterais de 1,5-D-galactofuranosídeo das moléculas de *galactomannan* (Stynen *et al.*, 1995) libertadas pelas diferentes espécies de *Aspergillus* e outros fungos (Figura 1.4).

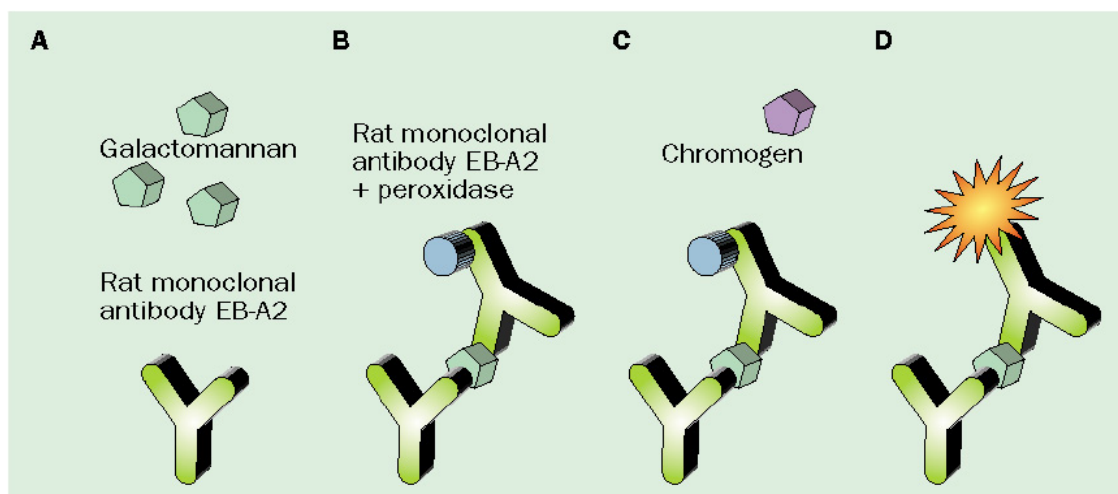


Figura 1.4: Princípio do teste Platelia®*Aspergillus* EIA (BioRad) para a detecção do *galactomannan* em amostras clínicas (Mennink-Kersten, M.A., 2004)

O *galactomannan* é um polissacarídeo solúvel na água, estando validado para ser detectado em lavados brônquicos, lavados broncoalveolares e soro. No entanto, a nível de investigação, de forma a ajudar um melhor diagnóstico, pode ser realizado também na urina, fluido estéril como LCR e biópsias (Wheat, 2005).

A detecção do *galactomannan* é especialmente útil em doentes que recebem tratamentos com base em corticosteróides, em doentes neutropénicos ou quando coexistem condições que mascaram o diagnóstico de AI, sendo por isso, uma técnica útil no seu diagnóstico (Upton *et al.*, 2005; Del Palacio *et al.*, 2003).

Outra vantagem da ELISA é a possibilidade de medir semi-quantitativamente os títulos de antígeno, e estes poderem ser monitorizados durante o tratamento. Uma diminuição da concentração de *galactomannan*, é indicativa da eficácia do tratamento utilizado (Latgé, 1999).

Vários estudos têm sido publicados a fim de avaliar para diagnóstico de AI, a detecção de *galactomannan* em lavados brônquicos (LB) e lavados broncoalveolares (LBA) (Klont *et al.*, 2001 e por Wheat, 2005). A detecção do antígeno *galactomannan* em LB e LBA é superior à detecção do mesmo em soro (Becker *et al.*, 2003). Sanguinetti *et al.*, (2003) descreve a detecção de *galactomannan* em LB e LBA para todos os doentes com AI. Uma recente meta-análise (Guo *et al.*, 2010) reporta que a sensibilidade do Platelia® *Aspergillus* em LB e LBA é de 90%, a especificidade é de 94%, o valor preditivo positivo e negativo é de 14,87 e 0,10, respectivamente. Estes autores concluíram que a maioria dos doentes com culturas negativas, mas com *galactomannan* positivo tem evitado uma biópsia do pulmão ou uma segunda broncoscopia. Sabe-se no entanto, que embora a sensibilidade do teste GM em doentes neutropénicos seja aproximadamente de 90% e a especificidade acima deste valor, em doentes não neutropénicos, a sensibilidade e a especificidade tem sido reportada como sendo menor, e mais variável com grandes limites de sensibilidade (Husain *et al.*, 2004; Fortun *et al.*, 2001; Aquino *et al.*, 2007).

Um factor que tem vindo a ser bastante discutido é o melhor índice (*cut-off*) para um resultado positivo e negativo, dado que a prevalência desta doença varia geograficamente.

Na Europa, o fabricante do kit Platelia® *Aspergillus*, originalmente recomendou interpretar um índice de DO $\geq 1,5$ como sendo positivo, e < 1 como negativo. Ou seja, os índices de DO entre 1,5 e 1 permaneciam indeterminados (Wheat *et al.*, 2003). Uma redução do limiar das amostras negativas de 1,0 a 0,8 e para as amostras positivas de 1,5 a 1 foi sugerido por Verweij *et al.* em 1998. Também na prática muitos centros europeus já usam índice de DO para o *cut-off* mais baixo, de 0,5 a 0,7 para classificar resultados positivos (Herbrecht *et al.*, 2002; Maertens *et al.*, 2004).

Limitações da pesquisa de *galactomannan* por EIA Platelia

Falso-positivos têm sido reportados consecutivamente em soros, LB e LBA em doentes tratados com piperacilina- tazobactam, ampicilina e amoxicilina/ ácido clavulânico

(Sulahian *et al.*, 2003). A origem exacta desta reactividade ainda não é conhecida. Estes são antibióticos semi-sintéticos derivados dos compostos naturais produzidos pelos fungos das espécies de *Penicillium*, logo, uma das razões poderá ser a presença de *galactomannan* nestes compostos. Estes problemas ocorrem tanto nos doentes adultos como nos pediátricos (Viscoli *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2004).

Têm sido reportados também, falso-positivos em neonatos e outros doentes pediátricos sem AI. Uma teoria que tem sido analisada para explicar o aumento de falso-positivos de *galactomannan* observado em doentes pediátricos, sugere que o ácido lipoteicoico, um constituinte da parede celular bacteriana do *Bifidobacterium bifidum*, abundantemente existente na microflora intestinal dos neonatos, causa uma reacção cruzada com o anticorpo monoclonal EB-A2, devido à estrutura molecular ser semelhante a resíduos das cadeias laterais do *galactomannan* (Marr *et al.*, 2004).

Também resultados de falso-positivos para o teste de *galactomannan* têm sido relatados em doentes bacteriémicos (Swanink *et al.*, 1997) e em alguns casos está mesmo relatado que poderá ser devido ao uso de antibióticos. Microrganismos não específicos têm sido conscientemente associados com reacções de falso-positivos relativamente ao *galactomannan* (Swanink *et al.*, 1997), o que limita a credibilidade desta análise em doentes com infecção associada.

Doentes submetidos a transplante do pulmão são mais propensos a ter resultados de *galactomannan* falso-positivos (Hussain *et al.*, 2004).

Assim, a taxa de resultados de falso-negativos oscila entre 8 a 10% e está relacionada com a presença de anticorpos anti-*Aspergillus* (formando imunocomplexos que impedem a ligação do anticorpo no EB-A2) (Singh and Paterson, 2005) e pela administração profilática ou empírica de antifúngicos com actividade anti- *Aspergillus* (Aquino *et al.*, 2007; Maertens *et al.*, 2007b), uma vez que o uso destes agentes pode levar à diminuição dos níveis de antigénios ao diminuírem a carga fúngica (Becker *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2003; Francesconi *et al.*, 2006).

Independentemente destas limitações o método de detecção de *galactomannan* apresenta mais vantagens do que desvantagens, principalmente no que se refere ao valor preditivo e negativo.

1.3.2.2 Diagnóstico histopatológico e citológico

Sempre que uma biópsia possa ser obtida de um nódulo no pulmão ou de uma área de consolidação, o exame histopatológico deve ser mandatário. É este que irá permitir o diagnóstico definitivo de uma doença invasiva provocada por fungos, e a exclusão de outros diagnósticos. Em cortes de tecido, o *Aspergillus* apresenta-se sempre septado e com hifas ramificadas (Herbrecht *et al.*, 2004). Em doentes oncológicos este diagnóstico nem sempre é possível dado ter riscos de trombocitopenia.

As hifas são melhor visualizadas com uma coloração especial para fungos, e as amostras obtidas por broncoscopia ou por biópsia de tecidos devem ser examinados com a coloração periodic acid-schiff (PAS) ou com a coloração de prata matenamina (Grocott). As estruturas fúngicas necróticas tornam-se visivelmente melhores com a coloração de Grocott do que com a de PAS, mas pelo menos um destes dois procedimentos de coloração deve ser realizado para confirmação (Ruhnke *et al.*, 2003). A coloração PAS tem a vantagem de fornecer um contracorante que revela os detalhes da célula hospedeira, arquitectura do tecido e resposta inflamatória (figura 1.5) (Hope *et al.*, 2005b), nomeadamente os septos das hifas, procurando assim diferenciar o género *Aspergillus* de outros filamentosos.

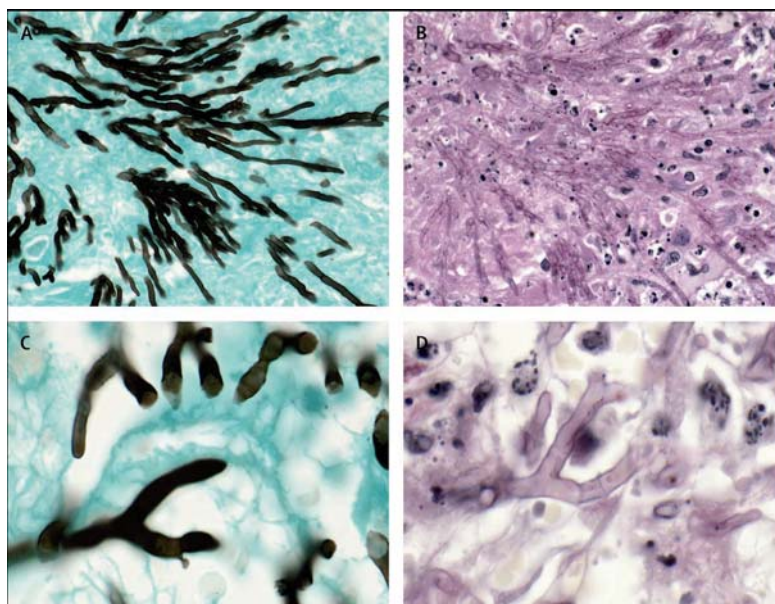


Figura 1.5: Aparência do *Aspergillus spp* em cortes histológicos

(A) Coloração de Grocott do pulmão de coelhos com aspergilose invasiva pulmonar experimental (ampliação $\times 400$); (B) Secção similar com coloração de PAS (ampliação $\times 400$); (C) e (D) Mostra uma ângulo agudo de 45° , que é típico de *Aspergillus spp* (ampliação $\times 630$).

As secções de Grocott demonstram a coloração proeminente e a aparência forte das hifas. Por outro lado, com a coloração de PAS há preservação dos detalhes de fundo histológicos e da morfologia das hifas, mas estas são menos visíveis contra o fundo. (Hope *et al* 2005b).

Na maioria das situações não é possível identificar o género do fungo (Hope *et al.*, 2005b). O *Aspergillus spp* é difícil de ser distinguido de outros fungos filamentosos, como o *Fusarium spp* ou o *Scedosporium spp* (Hope *et al.*, 2005b). Os septos podem ser difíceis de encontrar, o que pode tornar a distinção entre *Aspergillus spp* e Zygomycetos mais complicada (Hope *et al.*, 2005b). A maioria das vezes, o papel de um histopatologista não é identificar o tipo de fungos, mas sim a sua presença. A histopatologia só pode concluir se tem verdadeiras hifas fúngicas, e por sua vez a possibilidade de avaliar características típicas de *Aspergillus*. (Barnes and A.Marr, 2007).

1.3.2.2.3 Diagnóstico molecular

Desde os anos de 1990, diferentes técnicas de Polymerase Chain Reaction (PCR) têm sido usadas para detectar ADN fúngico (Maschmeyer *et al.*, 2007).

A detecção do material genético de *Aspergillus spp* em sangue, LB ou LBA por PCR é uma ferramenta sensível e específica para avaliar a presença de *Aspergillus*. No entanto, este método de diagnóstico falta ser *standardizado* internacionalmente, e os consensos para o uso do critério PCR no diagnóstico de AI para doentes de alto risco ainda não foram incluídas apesar de uma exponencial de estudos publicados (Halliday *et al.*, 2006; Buchheidt *et al.*, 2004).

A sensibilidade do teste é variável, mas sabe-se que é superior nas amostras de LB e LBA do que nas amostras de sangue ou soro (Donnelly, 2006).

A potencial utilidade da detecção de ADN é evidente dado que a maioria dos fungos patogénicos oportunistas têm um crescimento moroso ou são difíceis de isolar no meio de cultura, principalmente em doentes em que a terapêutica antifúngica foi instituída. No entanto, muitos falsos positivos têm sido reportados como resultado de contaminação de ADN fúngico (Einsele *et al.*, 1997; Loffler *et al.*, 2000).

O PCR é um teste muito sensível e pode detectar ADN de *Aspergillus spp* como um indicador precoce da presença de infecção (Quindós, 2006).

Dado a importância da detecção de ADN fúngico por PCR e de *galactomannan* no diagnóstico clínico, têm vindo a ser realizados estudos comparativos destes dois

métodos. Musher *et al.* compararam o método de detecção GM com o ADN em amostras clínicas de LBA, e concluíram que com um *cut-off* de 0,5, a sensibilidade do método de detecção do GM foi de 76%, comparado com 67% do PCR. A especificidade foi de 94% com a detecção do GM e de 100% com o PCR. A combinação destes dois métodos de diagnóstico, embora apresentem um maior custo, dão uma maior sensibilidade e possivelmente reduzem a necessidade de procedimentos invasivos.

Também Hadrich *et al.*, em 2010 reporta uma sensibilidade de 64% pela pesquisa de ADN por PCR comparativamente com 86% pela detecção do GM, e uma especificidade de 96% pelo PCR e 93% pelo Platelia® *Aspergillus*.

A incidência da doença influencia bastante o valor preditivo positivo e negativo dos métodos de diagnóstico. A detecção do antígeno parece ter um melhor valor preditivo positivo numa baixa incidência da doença, comparativamente com o PCR em sangue total. Cada ensaio tem os seus inconvenientes, com o método de detecção do GM a dar resultados falsos negativos e o PCR com resultados falso-positivos. No entanto, a vantagem do PCR é que um resultado negativo quase sempre é correlacionado com ausência da doença (Quindós, 2006).

1.3.3 Critérios para definições de Aspergilose Invasiva

O grupo de consensos da *European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group* (EORTC/MSG) publicou em 2002 (Ascioglu *et al.*, 2002) definições com critérios para as IFI. Estas definições apresentavam três níveis de certeza para o diagnóstico de IFI de “possível”, “provável” e “provada”, em doentes imunodeprimidos. Em 2008 surgem actualizações em que a DFI é instituída como “provada” e “provável” (De Pauw *et al.*, 2008).

Assim, o diagnóstico de AI provada requer que exames histopatológico ou citopatológico identifiquem achados de hifas fúngicas de amostras obtidas por aspiração com agulha ou de uma biópsia aspirativas com evidência de tecido danificado associado (microscopicamente ou inequivocamente por imagem), ou uma cultura com um resultado positivo de uma amostra obtida por um procedimento asséptico ou TAC com alterações ou sinais clínicos de (Tabela 1.1). Quanto ao diagnóstico de AI provável, este é definido como pelo menos um parâmetro clínico do hospedeiro e um critério microbiológico e um critério clínico a partir de um sítio consistente com a infecção

(Tabela 1.1). Tabela 1.1: Critérios da EORTC/MSG para diagnóstico de AI (Adaptado de De Pauw *et al.*, 2008)

Tipos de critério de diagnóstico	Critérios
Factors de Risco do hospedeiro	<p>História recente de neutropenia ($<0,5 \times 10^9$ neutrófilos/L [<500 neutrófilos/mm^3] por mais de 10 dias).</p> <p>Recepção de um transplante alogénico de células hematopoiéticas.</p> <p>Uso prolongado de corticosteróides</p> <p>Tratamento com imunossuppressores de células T (como a ciclosporina, bloqueadores de TNF-α, anticorpos monoclonais específicos, ou análogos de nucleosídeos)</p> <p>Imunodeficiência severa hereditária (como a doença granulomatosa crónica ou imunodeficiência combinada grave).</p>
Critério Microbiológico	<p>Teste citológico, microscópico ou cultural:</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>Aspergillus spp</i> em amostras de expectoração ou lavados broncoalveolares, indicado em um dos seguintes: Presença de elementos fúngicos; cultura com resultado positivo. <p>Detecção do antígeno <i>galactomannan</i> no plasma, soro ou lavado broncoalveolar.</p>
Critério Clínico	<p>Infecção do tracto respiratório inferior</p> <p>Quando há a presença de 1 dos 3 sinais na tomografia computadorizada: sinal do halo, sinal do ar crescente, ou cavitação.</p> <p>Sintomas de infecção do tracto respiratório inferior (tosse, dor no peito, hemoptise ou dispneia).</p> <p>Achados físicos ou atrito pleural.</p> <p>Qualquer um dos novos infiltrados que não cumprem com o critério maior.</p> <p>Efusão pleural</p>

1.4 Terapêutica

O efeito da administração precoce da terapêutica antifúngica sobre a sobrevivência tem vindo a ser estabelecido ao longo dos anos. A terapêutica deve ser iniciada assim que haja uma suspeita de AI, o que releva a importância da detecção do antígeno *galactomannan* que permite um diagnóstico precoce da infecção (Herbrecht *et al.*, 2004).

A última década deu lugar a uma considerável expansão na investigação farmacológica antifúngica e desenvolvimento clínico de vários compostos, bem como o estabelecimento de novas estratégias para o tratamento de AI. O polieno anfotericina B (AMB) desoxicolato e as suas formulações lipídicas (AMB complexo lipídico, AMB lipossómica e AMB dispersão coloidal), os triazoles itraconazole (ITC), voriconazole (VO) e posocanazole (POS) e a equinocandina caspofúngica (CAS) são compostos que foram licenciados para o tratamento de AI, tendo actividade *in vitro* e *in vivo* devidamente comprovada sobre as distintas espécies do género *Aspergillus* (Walsh *et al.*, 2008).

Em 2008 foi publicado um consenso pela “*Infectious Diseases Society of America*” (IDSA) *guidelines* para a prática clínica.

A estratégia na instituição terapêutica precoce tem vindo a ter uma boa correlação com o aumento de sobrevivência em doentes de risco (Herbrecht *et al.*, 2004; Vallejo and Rovira, 2010).

Assim, o tratamento empírico é administrado aos doentes de alto risco com sinais e sintomas sugestivos de DFI, como os doentes neutropénicos e com febre, que não respondem aos antibacterianos de alto espectro (Krishnan-Natesan and Chandrasekar, 2008). A estratégia utilizada tem sido iniciar-se este tratamento quando há a possibilidade de uma infecção fúngica, mas quando não existe documentação microbiológica, sendo a carta epidemiológica do centro um dado importante (Vallejo and Rovira, 2010). No momento de se iniciar o tratamento empírico num doente neutropénico com risco de IFI, é necessário saber, que fungo tem que cobrir e que 82% das infecções são devidas ao *Aspergillus* e à *Candida* (Vallejo and Rovira, 2010). Segundo os consensos publicado pela IDSA, no tratamento empírico para doentes de alto risco com neutropenia prolongada que permanecem com febre persistente, mesmo após a administração da antibióticoterapia, são recomendados os antifúngicos AMB lipossómica, itraconazole, voriconazole ou caspofungina (Walsh *et al.*, 2008).

O tratamento pré-emptivo para AI é baseado numa intervenção baseada no risco para doentes de alto risco com persistente neutropenia febril e com a presença de outra evidência de DFI, como cultura positiva, achados radiológicos, ou um resultado positivo do teste de detecção do antígeno *galactomannan* (Stephanie *et al.*, 2006). Este tratamento está a ganhar uma maior importância com a disponibilidade do teste de pesquisa de antígeno *galactomannan*. Este tipo de tratamento segundo a *guideline* publicada pela IDSA, no tratamento pré-emptivo para doentes de alto risco com neutropenia prolongada com febre persistente, são recomendados, assim como na terapêutica empírica, os antifúngicos AMB lipossómica, itraconazole, voriconazole ou a equinocandina, caspofungina (Walsh *et al.*, 2008).

O tratamento dirigido de eleição para a AI é o voriconazole. Este é aprovado em todo o mundo como a primeira terapêutica para a AI, com base nos resultados de um ensaio prospectivo, randomizado (Maschmeyer *et al.* 1994), que reporta sucesso e uma melhor taxa de sobrevivência no grupo do voriconazole do que no grupo de anfotericina-B.

Alguns agentes antifúngicos têm actividade limitada ou mesmo não activa contra determinados fungos patogénicos, como é o caso do voriconazole, que não tem actividade contra os Zygomycetes (Hope *et al.*, 2005b).

2 Objectivos

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo de coorte prospectivo com os objectivos de:

1. Avaliar a presença de *galactomannan* (GM) em lavados broncoalveolares (LBA) de forma a validar este marcador no diagnóstico precoce de aspergilose invasiva em doentes oncológicos.
2. Avaliar e determinar o melhor *cut-off* de GM para a validar o teste de diagnóstico da API.

3 Material e métodos

3.1 Amostra estudada

Neste trabalho foi realizado um estudo de coorte prospectivo entre Janeiro de 2010 e Julho de 2011, em 104 doentes com suspeita de aspergilose pulmonar.

Foram analisadas um total de 104 amostras de lavados brônquicos (48 LBA e 56 LB) recebidas no Serviço de Microbiologia do Instituto Português de Oncologia - *Comprehensive Cancer Center* do Porto, com cerca de 348 camas.

O grupo controlo estudado, dentro do mesmo período de tempo consistiu em 41 LB de doentes oncológicos que foram submetidos a broncoscopia para avaliação da doença oncológica, sem suspeita de doença infecciosa respiratória.

3.2 Exame micológico

A cultura para fungos foi realizada para todas as amostras clínicas de LB e LBA. Estas foram inoculadas em meio agar sabouraud (SGC2, BioMérieux Sa) e incubados durante 5 dias a 37°C. As espécies de *Aspergillus* foram identificadas pelas suas características culturais e pela morfologia dos seus conidiósporos e conídios.

3.3. Critérios avaliados e estudados no diagnóstico de API

A API foi definida segundo os critérios actualizados da EORTC/MSG (De Pauw, 2008). Foram recolhidas informações dos achados do exame citopatológico, para a presença de hifas filamentosas fúngicas, com a coloração Grocott e imagens de TAC torácica.

O GM positivo foi definido quando o valor de índice DO do GM ≥ 1 . A variável de resultado da API dos casos foram definidos como AI provável e/ou provada;

3.4 Detecção do antígeno *Galactomannan*

O teste ELISA sanduíche para a detecção do antígeno *Galactomannan* foi realizado pelo método Platelia® *Aspergillus*, (BIORAD) segundo as instruções do fabricante.

3.4.1 Processamento das amostras

Os LB e LBA com volumes superiores a 10mL foram centrifugados a 5000g durante 15 minutos, de forma a concentrar as amostras. Foram utilizadas alíquotas com um volume de 1mL para a detecção de GM. Foram utilizados controlos internos, controlo R3 (controlo negativo), R4 (*cut-off*) e R5 (controlo positivo) de acordo com o fabricante. Foram reconstituídos com um volume de 1000μL de água bidestilada (B. Braun Portugal), aguardando-se 2-3 minutos para o soro rehidratar totalmente. Distribuiu-se um volume de 300μL de cada controlo em 3 tubos de *eppendorf* de 1,5mL. Os tubos de cada controlo não utilizados foram congelados a -20°C.

Os lavados foram centrifugados a 10000g, durante 10 minutos e rejeitou-se 700μL de sobrenadante. Adicionou-se 100μL de R7 (solução de EDTA a 4%) à temperatura ambiente. As amostras de sangue foram colhidas em tubos de bioquímica (Becton Dickinson Vacutainer® Blood collection tubes). Após a centrifugação das mesmas, a 3750rpm durante 5 minutos, extraiu-se o soro, conservando-se as amostras à temperatura de +2-8°C. De cada soro foi retirado um volume de 300μL para um *eppendorf*. Todas as amostras e controlos foram homogeneizados vigorosamente por agitação e colocados durante 3 minutos a 120°C (para dissociar os complexos imunes e para precipitar as proteínas que poderiam interferir com o teste). Posteriormente, centrifugou-se a amostra a 10000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a detecção do antigénio *galactomannan*.

3.4.2 Reacção Imuno-Enzimática

Foi adicionado a cada poço um volume de 50μL do conjugado R6 (anticorpo monoclonal antigalactomannan marcado com peroxidase). Adicionou-se 50μL de sobrenadante de cada amostra e os controlos R3, R4 e R5 respectivamente. Pipetou-se 50μL do controlo negativo, R3, no primeiro poço, 50μL do *cut-off*, R4, em duplicado e 50μL de controlo positivo, R5, no quarto poço, e nos restantes poços adicionaram-se 50μL de sobrenadante tratado e em duplicado para cada amostra, registando-se a ordem das amostras. Todas as amostras foram testadas em duplicado. A microplaca foi tapada com selante de placas, de forma a que toda a superfície ficasse coberta. A microplaca foi encubada a 37°C durante 2h30 minutos. Terminando o tempo de incubação, retirou-se o selante e aspirou-se o conteúdo de cada poço e procedeu-se à lavagem da microplaca com o lavador automático PW40.

3.4.3 Detecção e leitura de GM

Para a detecção, preparou-se 200µL de solução de revelação (R8, tampão substrato de tetrametilbenzidina com ácido cítrico e acetato de sódio e R9, solução cromogénica de tetrametilbenzidina). Diluiu-se 50 vezes a solução de cromogénio concentrada. A cada poço foi adicionado um volume de 200µL da solução de revelação e colocou-se a microplaca no escuro à temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos. Acabando este tempo, a microplaca foi retirada do escuro e parou-se a reacção com o R10 (1,5 M de ácido sulfúrico), ressuspendendo-se a solução em cada poço. A leitura da microplaca foi feita no período de 30 minutos, e procedeu-se à leitura da DO utilizando-se o leitor PR 2100. Esta leitura foi realizada a 450nm com filtro de referência de 620nm.

3.4.4 Interpretação dos resultados

O índice de densidade óptica (DO) foi calculado dividindo a DO da amostra clínica pelo DO da amostra de controlo *cut-off*, R4.

Para que o teste seja validado, a DO do controlo R4 deve estar entre 0,3-0,8; O índice do controlo positivo R5 deve ser maior que 2 (O índice é igual à densidade óptica do controlo positivo R5 E R3 média densidade óptica do controlo *cut-off* R4, que tem que ser maior que 2); O índice do controlo negativo tem que ser menor que 0,4.

A análise positiva para GM foi definida quando o índice de GM foi superior ou igual a 1, segundo os consensos da EORTC/MSG (De Pauw *et al.*, 2008)

3.5 Detecção do ADN de *Aspergillus spp* por PCR

Utilizou-se um volume de 1000µL das amostras de LB e LBA. Estes foram sujeitos a uma centrifugação de 10000g, durante 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 180µL de *tissue lysis buffer* (Roche), 180µL de *bacterial lysis buffer* (Roche), 40µL de *proteinase K* recombinant (Roche) e 10µL de liticase (Sigma Aldrich).No isolamento de ADN fúngico utilizou-se o kit *QiampDNA mini kit* (Qiagen,Izasa, Madrid, Spain),com uma incubação prévia com liticase durante 1 hora. O PCR foi realizado com um volume de ADN de 10µL, e amplificado no termociclador *Light Cycler®* (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Foram utilizados *primers* específicos para a região do gene 18SrRNA, F:5'-ATTTGGAGGGCAAGTCTGGT e R:5'-

GATCCCTAGTCGGCATAGTT; As sondas utilizadas foram 5'-TGAGGTTCCCCAGAAGGAAAGGTCCAGC, marcada com o fluorocromo Red640 e 5'-GTTCCCCCCACAGCCAGTGAAGGC, marcada na extremidade 3' com fluoresceína. Todos os *primers* e sondas foram sintetizados pela Tibmolbiol (Berlim, Alemanha). Como controlo interno foi utilizado a estirpe com a referência de *Aspergillus fumigatus* UKNEQAS 5526. As curvas de fluorescência foram analisadas com o *software Light Cycler* 1.5. Os resultados não quantificados foram expressos pela determinação do limite de detecção ou *crossing point* (cp), que marca o ciclo no qual a fluorescência das amostras se torna significativamente menor que o sinal base. Foram adicionados a cada corrida controlo positivo de ADN de *Aspergillus spp* (UKNEQAS5526) e um outro negativo de água esterilizada. Durante todo o processo foi tido em conta, medidas rigorosas para prevenir a contaminação do ADN.

3.6 Análise estatística

As variáveis estudadas índice de GM, ADN, cultura micológica, citologia, dados clínicos, imagiológicos e factores de risco dos doentes foram introduzidas em ficheiro Excell.

A análise estatística dos resultados foi efectuada com auxílio do *software* estatístico SPSS (Versão 18, SPSS Inc, 2010). A análise de qui-quadrado foi utilizada para comparar variáveis categóricas, com um nível de significância de 5%. O valor de p foi obtido pelo teste χ^2 e considerado estatisticamente significativo quando $<0,05$.

A validade do teste do GM foi medida pela sua sensibilidade e especificidade. A sensibilidade foi calculada como a proporção de GM positivos ($GM \geq 1$) com diagnóstico API (provado ou provável). A especificidade foi calculada como a proporção de casos GM negativos ($GM \leq 1$) na ausência de API. Foram também calculados os valores preditivos positivo e negativo do teste de diagnóstico. A área sob características *receiver operating* (Curva de ROC) foi construída para avaliar como as alterações do *cut-off* do GM alteravam a sensibilidade e especificidade do teste.

4 Resultados

Casos estudados

Foram avaliadas amostras respiratórias de 104 doentes oncológicos com suspeita de API que foram submetidos a broncoscopia, para estudo microbiológico e citológico (58 LB e 46 LBA). A amostra de doentes estudada tinha uma idade média de $51 \pm 1,9$ anos (12–85).com 64% do sexo masculino (n=67) e 36% feminino (n=37).

Destes, 54 doentes apresentavam doença hematológica (52%), em que metade tinha diagnóstico de leucemia, 35% de linfoma, 9,3% de mieloma múltiplo e 5,6% com Anemia de Falconi. Em 48% dos casos estudados tinham tumores sólidos, e em 1,9% não tinham evidência de malignidade até a data do estudo (n=2) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Características clínicas dos doentes estudados com suspeita API (n=104)

	<i>n</i>	API (n= 13)	Sem API (n= 91)
Doentes hematológicos (n=54)			
LMA	15	2	13
LLA	9	1	8
LMC	2	1	1
LLC	1	1	0
LNH	14	1	13
LH	3	0	3
MM	5	0	5
Anemia Falconi	3	1	2
L. Burkitt	2	0	2
Tumores sólidos	48	6	42
SE oncológica	2	0	2
Total	104	13	91

LMA-Leucemia Mieloide Aguda; LLA- Leucemia Linfoblástica Aguda;
LLC-Leucemia Linfoblástica Crônica; LNH- Linfoma não- Hodgkin;
LH-Linfoma Hodgkin; API: Aspergilose Pulmonar Invasiva; Se Oncológica: Sem Evidencia Oncológica

No que respeita a variável de resultado API, dos casos estudados com suspeita de AI, foi diagnosticado API em 12,5% dos doentes (n=13/104). Destes, 54% dos casos eram doentes hematológicos (n=7/13) e em 46% em tumores sólidos (n=6/13).

Em 87,5% dos casos estudados (n=91) não tinham critérios de evidência de API provável ou provada. Dois dos casos não tinham estabelecido doença maligna, em que um deles tinha o diagnóstico de tuberculose ganglionar.

Grupo controlo

Durante o período do estudo, foram submetidos a broncoscopia para diagnóstico oncológico 41 doentes sem evidência de infecção, com uma média de idade de 61,2±13,2 anos (12-88). Todos os doentes tinham tumores sólidos nomeadamente: cancro pulmão (n= 29), esófago (n=9) e da mama, (n=3). Os lavados brônquicos foram analisados e utilizados como controlo negativo de API para o ensaio de GM.

O índice de GM médio das amostras foi de 0,67±0,3 (0,16-1,35) e em sete doentes (17%) o GM foi positivo (GM≥1), com cultura para *Aspergillus* negativa, ADN *Aspergillus* negativo, e citologia negativa, sem haver evidência microbiológica e TAC sem evidência de infecção.

Crítérios laboratoriais: Galactomannan, ADN, Cultura, Citologia e TAC torax

Nas amostras respiratórias avaliadas foram estudados os parâmetros laboratoriais: antigénio GM (n=104), ADN de *Aspergillus spp* (n=96), a cultura micológica (n=104) e a citologia (n=103) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Resultados dos parâmetros laboratoriais estudados em relação ao diagnóstico de API

	API (n=13)	Sem API (n=91)	P
GM Positivo (n= 54)	13 (100%)	41 (45%)	0,000
Cultura <i>Aspergillus</i> + (n=8)	6 (46%)	2 (0,2%)	NS
ADN <i>Aspergillus</i> + (n=20)	8 (62%)	12 (13%)	0,000
Citologia + (n=10)	6 (46%)	4 (0,4%)	NS

Cultura *Aspergillus* +: Isolamento e Identificação de *Aspergillus spp*

GM Positivo: Índice de GM ≥1

Citologia + : Presença de hifas filamentosas

API: Aspergilose Pulmonar Invasiva

NS: Não significativo

Na análise do ensaio GM, pelo método *standard* Platelia® *Aspergillus*, observou-se uma variação da DO do índice de antígeno de 0,17 a 8,50 na amostra estudada. Em 52% dos casos (n=54/104) o GM foi positivo (GM≥1). Em todos os casos com o diagnóstico de API o GM foi positivo (≥1) (Tabela 4.3). A sensibilidade deste teste para diagnóstico de API (provável ou provada) foi de 100% e uma especificidade de 45% com IC95% [0,35-0,55]. O valor preditivo positivo (VPP) para o teste de GM foi de 24% e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 93%, no diagnóstico de API.

A pesquisa do ADN de *Aspergillus spp* foi positiva em 21% dos casos com suspeita de API estudados (n=20/96) e destes apenas em 62% (n=8/13) dos casos se associou à variável com API, com significado estatístico (Tabela 4.3).

No exame cultural micológico, foi observado o isolamento de estirpes fúngicas em 23 casos (22%), apenas oito foram identificadas como *Aspergillus spp*. Em seis casos foi associada a variável de resultado API, mas sem significado estatístico. Outros casos de *Candida spp* (n=14) e *Scedosporium* (n=1) também foram observados nas culturas mas em casos sem evidência de API, provável ou provada.

A citologia foi positiva em apenas 10% dos casos suspeitos de AI estudados (n=10/104). Em 46% dos casos associado ao diagnóstico de API, sem significado estatístico (Tabela 4.3).

Nos casos sem API (N=91), o GM foi positivo em 45% dos casos, 13% de ADN positivo, 0,2% de cultura de *Aspergillus* positivo, 0,4% com presença de hifas (Tabela 4.3).

Na associação dos parâmetros laboratoriais GM (n=104) e ADN de *Aspergillus spp* (n=96), em 13% dos casos com estes parâmetros, sem diagnóstico de API (11/83), observou-se que o resultado dos 2 parâmetros eram concordantes entre si e positivos. Mais ainda, observou-se um caso de GM negativo em que o PCR foi positivo para *Aspergillus spp* (Tabela 4.4). Nos casos com API (n=13), apenas 61,5% (8/13) apresentaram estes dois parâmetros positivos.

Tabela 4.4: Análise da associação de GM e ADN de *Aspergillus spp* para a variável API

	GM	
	GM Positivo	GM Negativo
API (n=13)		
ADN Pos (n= 8)	8 (100%)	0
ADN Neg (n=5)	5 (100%)	0
Sem API (n= 83)		
ADN Pos (n= 12)	11 (91,7%)	1 (8,3%)
ADN Neg (n=71)	45 (63,4%)	26 (36,6%)

API: Aspergilose Pulmonar Invasiva

GM Positivo: Índice de GM ≥ 1

Tomografia axial computadorizada (TAC)

O critério de diagnóstico imagiológico TAC torácica foi associado como critério do diagnóstico de API nos doentes com suspeita de AI, segundo os consensos da EORTC, não existindo casos com TAC alterada.

Em 73% casos com API foi a TAC tinha uma imagem de vidro despolido.

Factores de Risco UCI, TMO, QT, RT, Corticoterapia e neutropenia

Em 23% dos casos estudados com diagnóstico de API estavam internados em Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) (n=3), 31% tinha sido submetido a Transplante de Medula Óssea (TMO) (n=3) três deles alogénicos, 77% dos casos tinham tido tratamento prévio com quimioterapia (n=10), em 38,5% com corticosteróides (n=5), em apenas um caso com neutropenia prolongada (>10 dias) e em nenhum caso com tratamento com radioterapia prévia.

Terapêutica antifúngica

Dos 13 doentes com API, 8 (62%) já tinham iniciado terapêuticas antifúngicas antes da análise de GM, nomeadamente: o fluconazol (n=2), itraconazol (n=2), caspofungina (n=2), anfotericina lipossómica (n=1) e o posaconazol (n=1).

Prognóstico de API

Dos casos estudados com o diagnóstico de API (n=13), 54% faleceram e destes 57% eram doentes hematológicos com leucemia (n=4).

Factores de risco nos resultados de GM falso-positivos

A *piperacilina/tazobactam* e/ou *amoxicilina/ácido clavulânico*, a corticoterapia e a quimioterapia foram os factores de risco analisados para avaliar os resultados de GM falso-positivos.

Tabela 4.5: Factores de risco para resultados de GM falso-positivos

	GM \geq 1 sem API nº de casos (%)
Pip/Tazo ou Amox/Ac. Clav	19/41 (46%)
QT Pré	21/41 (51%)
Corticoterapia Pré	15/41 (37%)

Nos casos estudados sem diagnóstico de API, o GM foi positivo em 46% dos doentes que estavam a tomar *piperacilina/tazobactam* e/ou *amoxicilina/ácido clavulânico* (n=19), em 51% dos doentes que tinham feito quimioterapia prévia (n=21) e em 37% que receberam corticosteroides (n=15) (Tabela 4.5).

Determinação de um cut-off para a performance do GM no diagnóstico de API na amostra estudada

Na amostra estudada foi avaliado o *cut-off* de GM que melhor diferenciava os casos

com e sem API, desta forma a análise da curva de ROC foi realizada.

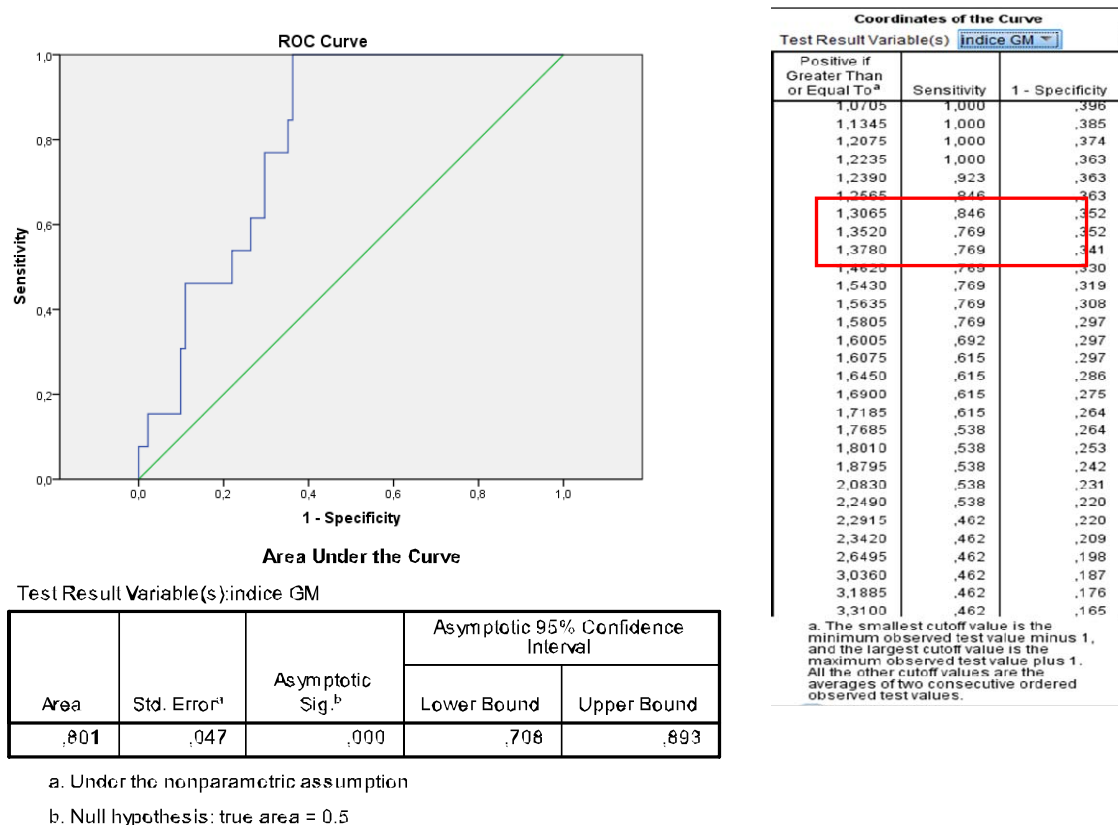


Figura 4.6: Curva de ROC para valores de GM observados nos 13 casos com API

A área sob a curva de ROC (AUC) foi de 0,801 com um IC 95% de [0,708-0,893], com um nível de significância de $p < 0,05$. Sendo a área acima de 0.70, considera-se que a exactidão do teste GM é boa para que o índice de GM escolhido seja capaz de distinguir indivíduos com e sem API.

De forma a não perder muita sensibilidade no teste a escolha do *cut-off* $\geq 1,3$ torna o teste GM com uma menor sensibilidade (85%), mas com uma especificidade de 65%, maior do que aquela que encontramos no *cut-off* ≥ 1 .

Discussão

Neste trabalho avaliamos a presença do antígeno GM em amostras invasivas (LBA e LB) em doentes oncológicos com suspeita de aspergilose pulmonar, de forma a validar este marcador no diagnóstico precoce. A prevalência de API nos casos com suspeita dos doentes oncológicos estudadas entre Janeiro de 2010 e Julho de 2011 foi de 12,5% (13/104), quando focamos o doente hematológico a prevalência foi de 6,7% (7/104). Os

doentes com maior risco de desenvolver AI são alotransplantados de medula óssea, com neutopenia prolongada ou sob tratamento de corticosteroides, doentes com leucemias, doentes submetidos a radioterapia e a quimioterapia. Está reportado que em doentes hematológicos há uma melhor sensibilidade na detecção do antígeno GM (Meersseman *et al.*, 2008). Uma meta-análise reporta que em doentes hematológicos a sensibilidade e especificidade da detecção do antígeno GM é de 70% e 92%, respectivamente (Pfeiffer *et al.*, 2006).

No exame cultural micológico, apenas em 6 casos foram isolados *Aspergillus*, nas amostras com GM positivo, em doentes que apresentavam API. Em metade dos casos com infecção não se obteve crescimento cultural do fungo, que evidencia a baixa sensibilidade da cultura no diagnóstico de AIP.

Chamilos e Kontoyiannis (2006) revelam que o isolamento de *Aspergillus* a partir de amostras do tracto respiratório inferior apresentam uma sensibilidade de 30% para as culturas. Foi identificado um caso com isolamento de um *Scedosporium* numa amostra que apresentou um resultado de GM negativo, o que seria de esperar, uma vez que este não tem na sua constituição celular o GM que é específico do género *Aspergillus*.

A potencialidade da detecção de ADN é evidente dado que a maioria dos fungos patogénicos oportunistas têm um crescimento moroso ou são difíceis de isolar no meio de cultura, principalmente naqueles que a terapêutica antifúngica foi instituída (Einsele *et al.*, 1997). A pesquisa de ADN de *Aspergillus* por PCR é cerca de 19 vezes mais sensível que a cultura (Loeffler *et al.*, 2002). Uma sensibilidade de 79 a 100% e uma especificidade de 81 a 93% tem sido documentada, dependendo da metodologia usada (Buchheidt *et al.*, 2001; Hebart *et al.*, 2003; Kami *et al.*, 2001). Este meio de diagnóstico quando realizado em amostras de LBA mostra um valor preditivo negativo para AI de 92 a 99% e um valor preditivo positivo baixo, o que reflecte a colonização do tracto respiratório (Bart-Delabesse *et al.*, 1996). Na pesquisa de ADN de *Aspergillus spp.*, dos 20 casos positivos, foi possível comprovar 8 com API. No entanto, em 13% (11/83) dos casos sem API, tanto o GM como a presença de ADN para *Aspergillus* foi positiva, sugerindo a possível colonização com *Aspergillus spp.* A sensibilidade da pesquisa de ADN de *Aspergillus* foi menor do que o teste GM, mas mais específica, principalmente quando existem falso-positivos. A combinação dos métodos de diagnóstico de pesquisa do antígeno GM e de ADN de *Aspergillus*, apesar de um maior custo, apresentam uma maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico provável ou provada de API.

Em 23% dos doentes com API estavam admitidos na UCI., sendo esta frequência semelhante descrita em muitos estudos com uma elevada prevalência desta infecção, em doentes de alto risco (Herbrecht *et al.*, 2006).

Nos casos de doentes sem diagnóstico de AP, 48% dos casos foi observado GM positivo, mostrando ser falso-positivos. A análise univariada dos factores de risco para GM falso-positivos revelou que o tratamento com *piperacilina/tazobactam* e/ou *amoxicilina/ácido clavulânico*, são factores que levam à existência de falso-positivos, entre outros. Neste estudo o GM foi positivo em 46% dos doentes que estavam a tomar estes antibióticos, sem ter sido provado API nesses casos. Falsos positivos têm sido reportados em LB e LBA em doentes tratados com estes antibióticos (Sulahian *et al.*, 2003), em doentes adultos como em pediátricos (Viscoli *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2004). Embora ainda não seja conhecida qual a origem desta reactividade, pensa-se que uma das razões poderá ser por estes antibióticos serem derivados dos compostos naturais produzidos pelos fungos das espécies de *Penicillium*, o que poderá indicar a presença de GM nestes compostos.

Na análise dos factores de risco para os casos GM positivos sem API (n=41), o uso de corticosteróides foi observado em 37% dos casos, o que já tinha sido descrito por outros autores (Gao *et al.*; Guinea *et al.*, 2009) para esta população de risco.

Neste estudo o GM foi positivo em 51% dos doentes que estavam a realizar ou tinham realizado previamente quimioterapia, sem ter sido provado API nesses casos. De acordo com Cornet *et al.* (2002), a quimioterapia é um factor de risco associado a uma maior incidência desta infecção.

Como segundo objectivo deste trabalho, para determinar o melhor *cut-off* do índice de GM para a API, na prevalência desta infecção na amostra em estudo, foram utilizadas as curvas de ROC. A excelente sensibilidade do GM em amostras de LBA pode ser contrabalançada com a baixa de especificidade, deve-se à ocorrência de falso-positivos do teste ou à falta de infecção provada. De forma de ter mais validade num resultado, eliminando os falso-positivos do teste provocados pelo *piperacilina/tazobactam* ou *amoxicilina/ac. clavulânico* entre outros, é aumentando o poder no valor preditivo negativo. A escolha do $\text{cut-off} \geq 1,3$ para o teste GM, tornou-o com menor sensibilidade (85%), mas com uma especificidade de 65%, maior do que aquela que encontramos no $\text{cut-off} \geq 1$.

A melhor amostra no diagnóstico na infecção pulmonar será sempre a biópsia. No entanto, esta nem sempre é possível pelo *status* clínico do doente com riscos de

trombocitopenia ou até devido à situação logística institucional da radiologia de intervenção e pela biópsia ter um carácter específico para que se consiga fazer a pesquisa com material em quantidade desejável. Os métodos não invasivos (serológicos), são importantes na análise deste marcador precoce no diagnóstico precoce de AI, sendo importante na monitorização da terapêutica eficaz desta infecção

6 Conclusões

A detecção semi-quantitativa de GM em amostras brônquicas, é uma ferramenta útil e sensível para o diagnóstico precoce da API. Assim, a possibilidade de detectar com rapidez o antigénio GM parece promissor no diagnóstico precoce e rápido para uma eficaz intervenção terapêutica, sendo a presença de falso-positivos a ter em conta na análise do teste. O valor deste marcador tem que estar em associação com outros parâmetros laboratoriais e clínicos, sendo o valor preditivo do GM variável com a prevalência desta infecção em doentes de risco.

Trabalho futuro

Um recente marcador serológico (1,3)- β -D-glucano foi recentemente incluído nos critérios de diagnóstico das doenças fúngicas invasivas (DFI) da EORTC/MSG. O (1,3)- β -D-glucano é um constituinte da parede celular da maioria de vários fungos incluindo *Aspergillus spp*, estando ausente nos *Zygomycetes* e *Cryptococcus neoformans*. Embora a sensibilidade na detecção de DFI tenha-se mostrado muito elevada (80-90%) a sua especificidade na IFI é bastante menor dado a análise deste marcador não diferenciar a etiologia fúngica da infecção invasiva, tendo implicações nas estratégias terapêuticas da infecção invasiva.

Assim a proposta de trabalho de investigação seria, utilizando métodos não-invasivos, em sub-grupos de doentes oncológicos de alto risco com suspeita de IFI incluindo AI, determinar qual será o papel destes marcadores serológicos GM e (1,3)- β -D-glucano, combinados, na detecção precoce de aspergilose invasiva. Esta abordagem permitirá demonstrar com estes marcadores biológicos combinados, um valor preditivo de doença fúngica com impacto na abordagem da terapêutica pré-emptiva, em doentes imunodeprimidos com elevada suspeição.

8 Referências bibliográficas

Ader, F. 2010. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: An emerging disease. *Curr Infect Dis Rep* 12:409-416.

Alexander, B.D., Pfaller, M.A. 2006. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clinical Infectious Diseases* 43(1):S15-s27.

Andreas, S., Heindl, S., Wattky, C., Moller, K., Ruchel, R. 2000. Diagnosis of pulmonary aspergillosis using optical brighteners. *European Respiratory Journal* 15(2): 407-411.

Aquino, V.R., Goldani, L.Z., Pasqualotto, A.C. 2007. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* 163(4):191-202.

Ascioglu, S., Rex, J.H., de Pauw, B., Bennett, J.E., Bille, J., Crokaert, F., Denning, D.W., Donnelly, J.P., Edwards, J.E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, O., Maertens, J., Meis, J.F., Patterson, T.F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P.M., Stevens, D.A., Walsh, T.J. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. 2002. *Clinical Infectious Diseases*. 34(1):7-14.

Balajee, S.A., Nickle, D., Varga, J., Marr, K.A. 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell* 5(10):1705–1712.

Barnes, P.D., Marr, K.A. 2006. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infectious Disease Clinics of North America* 20(3):545-561.

Barnes, P.D., Marr, K.A. 2007. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *British Journal of Hematology* 139: 519-531.

Becker, M.J., de Marie, S., Willemse, D., Verbrugh, H.A., Bakker-Woudenberg, I.A. 2000. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *Journal of Clinical Microbiology* 38(4):1434-1438.

Becker, M.J., Lugtenburg, E.J., Cornelissen, J.J., Van der Schee, C., Hoogsteden, H.C., de Marie, S. 2003. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in hematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *British Journal of Haematology* 121:448-457.

Bhabhra, R., Askew, D.S. 2005. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Medical Mycology* 43(1):S87-S93.

Bhatti, Z., Shauka, A., Almyroudis, N.G., Segal, B.H. 2006. Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia* 162(1):1–15.

Blum, U., Windfuhr, M., Buitrago-Teelz, C., Sigmund, G., Herbst, E.W., Langer, M. 1994. Invasive pulmonary aspergillosis. MRI, CT, and plain radiographic findings and their contribution for early diagnosis. *Chest* 106(4): 1156–1161.

Brown, M.J., Worthy, S.A., Flint, J.D., Müller, N.L. 1998. Invasive aspergillosis in the immunocompromised host: utility of computed tomography and bronchoalveolar lavage. *Clinical Radiology* 53(4):255-257.

Brummer, E., Maqbool, A., Stevens D. A. 2001. In vivo GM-CSF prevents dexamethasone suppression of killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by bronchoalveolar macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 70(6):868–872.

Buchheidt, D., Baust, C., Klandny, H., Ritter, J., Suedhoff, T., Baldus, M., Seifarth, W., Leib-Moesch, C., Hehlmann, R. 2001. Detection of *Aspergillus* Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples from Immunocompromised Patients by Means of 2-Step Polymerase Chain Reaction: Clinical Results. *Clinical Infectious Diseases* 33(4): 428-435.

Buchheidt, D., Hummel, M., Scheiermacher, D., Spiess, B., Schwerdtfeger, R., Cornely, O.A. Wilhelm S, Reuter S, Kern W, Südhoff T, Mörz H, Hehlmann R. 2004. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology* 125(2):196-202.

Caillot, D., Casasnovas, O., Bernard, A., Couaillier, J.F., Durand, C., Cuisenier, B., Solary, E., Piard, F., Petrella, T., Bonnin, A., Couillault, G., Dumas, M., Guy, H. 1997. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *Journal of Clinical Oncology* 15(1):139–147.

Chamilos, G., Kontoyiannis, D.P. 2006. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology* 44:S163-S172.

Chander, J., Chakrabarti, A., Sharma, A., Saini, J.S., Panigrahi, D. 1993. Evaluation of Calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer. *Mycoses* 36(7-8): 243–45.

Chang, Y.C., Tsai, H.F., Karos, M., Kwon- Chung, K..J. 2004. THAT, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics Biology* 41(9):888-896.

Chen, K.Y., Ko, S.C., Hsueh, P.R., Luh, K.T., Yang, P.C. 200. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. *Chest* 120(1):177-184.

Connolly, J.E., McAdams, H.P., Erasmus, J.J., Rosado-de-Christenson, M.L. 1999. Opportunistic fungal pneumonia. *Journal of Thoracic Imaging* 14(1):51-62.

Cornet M, Fleury L, Malso C, Bernard JF, Brucker G. 2002. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *Journal of Hospital Infection* 51(4): 288-296.

Cunningham I. 1992. Pulmonary infections after bone marrow transplant. *Seminars in respiratory infections* 7(2):132-8.

De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P., Stevens, D.A., Edwards, J.E., Calandra, T., Pappas, P.G., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C.A., Denning, D.W., Patterson, T.F., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W.E., Herbrecht, R., Hope, W.W., Kibbler, C.C., Kullberg, B.J., Marr, K.A., Muñoz, P., Odds, F.C., Perfect, J.R., Restrepo, A., Ruhnke, M., Segal, B.H., Sobel, J.D., Sorrell, T.C., Viscoli, C., Wingard, J.R., Zaoutis, T., Bennett, J.E. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 46(12):1813-1821.

Del Bono, V., Mikulska, M., Viscoli, C. 2008. Invasive aspergillosis: diagnosis, prophylaxis and treatment. *Current Opinion in Hematology* 15(6):586-593.

Del Palacio, A., Cuétara, M.S., Pontón, J. 2003. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Ver Iberoam Micol* 20:90-98.

Denning, D. 1998. Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 26(4):781–805.

Denning, D.w., Kibbler, C.C., Barnes RA. 2003. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 3(4):230-240.

Donnelly, J.P. 2006. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. *Clinical Infectious Diseases* 42(4):487-489.

Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhofer, I., Müller, C.A., Bowden, R.A., van Burik, J., Engelhard, D., Kanz, L., Schumacher, U. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6):1710-1717.

Einsele, H., Hebert, H., Kauffmann- Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., Klingebiel, T., Dietz, K., Löffler, J., Bokemeyer, C., Müller, C.A., Kanz, L. 2005. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 25(7): 757-763.

Fortun, J., Martín, P., Alvarez, M.M., Sanchez-Sousa, A., Quereda, C., Navas, E., Barcena, R., Vicente, E., Candelas, A., Honrubia, A., Nuño, J., Pintado, V., Moreno, S. 2001. *Aspergillus* antigenemia sandwich-enzyme immunoassay test as a serodiagnostic method for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Transplantation* 71(1):145-149.

Francesconi, A., Kasai, M., Petraitiene, R., Petraitis, V., Kelaher, A.M., Scaufele, R., Hope, W.W., Shea, Y.R., Bacher, J., Walsh, T.J. 2006. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 44(7):2475-2480.

Gao, X., Chen, L., Hu, G., Mei, H. 2010. Invasive pulmonary aspergillosis in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and the diagnostic value of combined serological tests. *Annals of Saudi Medicine* 30(3): 193–197.

Gerson, S.L., Talbot, G.H., Hurwitz, S., Strom, B.L., Lusk, E.J., Cassileth, P.A. 1984. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Annals of Internal Medicine* 100: 345-351.

Greene, R.E., Schlamm, H.T., Oestmann, J.W., Stark, P., Durand, C., Lortholary, O., Wingard, J.R., Herbrecht, R., Ribaud, P., Patterson, T.F., Troke, P.F., Denning, D.W., Bennett, J.E., de Pauw, B.E., Rubin, R.H. 2007. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clinical Infectious Diseases* 44(3):373–379.

Gugnani, H. C. 2003. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front. Biosci.* 8:s46-s357.

Guinea, J., Torres-Narbona, M., Gijon, P., Muñoz, P., Pozo F., Peláez, T., Miguel, J., Bouza, E. 2010. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clinical microbiology and infection* 16:870-877.

Guo, Y.L., Chen, Y.Q., Wang, K., Qin, S.M., Wu, C., Kong, J.L. 2010. Accuracy of BAL Galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis. A bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest* 138(4):817-824.

Hadrich, I., Mary, C., Makni, F., Elloumi, E., Dumon, H., Ranque, A., Ranque, S. 2010. Comparison of PCR-ELISA and Real-Time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with hematological malignancies. *Medical Mycology* 1:1-6.

Halliday, C., Hoile, R., Sorrell, T., James, G., Yadav, S., Shaw, P., Bleakley, M., Bradstock, K., Chen, S. 2006. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cells transplants and patients with acute leukaemia. *British Journal of Haematology* 132(4):478-486.

Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Loeffler, J., Monod, M., Latgé, J. P., Einsele, H. 2002. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* 100: 4521-4528.

Herbrecht, R., Letscher-Bru, V., Oprea, C., Lioure, B., Walle, J., Campos, F., Villard, O., Liu, K.L., Natarajan-Ame, S., Lutz, P., Dufour, P., Bergerat, J.P., Candolfi, E. 2002. *Aspergillus galactomannan* detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 20:1898-906.

Herbrecht, R., Denning, D. W., F.R.C.P., Patterson, T. F., Bennett, J. E., Greene, R. E., Oestmann, J. W., Kern, W. V. Marr, K. A., Ribaud, P., Lortholary, O., Sylvester, R. Rubin, R. H., Wingard, J. R., Stark, P., Durand, C., Caillot, D., M.D., Thiel, E., P. H., Chandrasekar, Hodges, M. R., Schlamm, H. T., Troke, P. F., Ben de Pauw. 2006. Voriconazole versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. *The New England Journal of Medicine* 347:408-415.

Herbrecht, R., Natarajan-Amé, S., Letscher-Bru, V., Canuet, M. 2004. Invasive pulmonary Aspergillosis. *Semin. Respir. Crit. Care. Med* 25(2):191-202.

Heussel, C.P., Kauczor, H.U., Heussel, G.E., Fischer, B., Begrich, M., Mildemberger, P., Thelen, M. 1999. Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem-cell transplant recipients: use of high-resolution computed tomography. *Journal of Clinical Oncology* 17(3):796-805.

Hope, W.W., Walsh, T.J., Denning, D.W. 2005a. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus spp.* *Medical Mycology* 43(1):s207-s238.

Hope, W.W., Walsh, T.J., Denning, D.W. 2005b. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases* 5(10):609-622.

- Horii, K.A., Nopper, A.J. 2007. Emerging cutaneous infections in the premature neonate. *Advances in Dermatology* 23:177–195.
- Husain, S., Kwak, E.J., Obman, A., Wagener, M.M., Kusne, S., Stout, J.E., McCurry, K.R., Singh, N. 2004. Prospective assessment of Platelia *Aspergillus* galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 4(5):796-802.
- Kamberi, M., Brummer, E., Stevens, D.A. 2002. Regulation of bronchoalveolar macrophage proinflammatory cytokine production by dexamethasone and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after stimulation by *Aspergillus* conidia or lipopolysaccharide. *Cytokine* 19(1):14–20.
- Kami, M., Fukui, T., Ogawa, S., Kazuyama, Y., Machida, U., Tanaka, Y., Kanda, Y., Kashima, T., Yamazaki, Y., Hamaki, T., Mori, S., I., Akiyama, H., Mutou, Y., Sakamaki, H., Osumi, K., Kimura, S., Hirai, H. 2000. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 33:1504-1512.
- Klont, R.R., Meis, J.F.G.M., Verweij, P.E. 2001. Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clinical microbiology and infection* 7(2):32-37.
- Klont, R.R., Mennink-Kersten, M.A.S.H., Verweij, P.E. 2004. Utility of *Aspergillus* Antigen Detection in Specimens. Other than Serum Specimens. *Clinical Infectious Diseases* 39:1467–74.
- Kradin, R.L., Mark, E.J. 2007. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 132:606-614.
- Krishnan-Natesan, S., Chandrasekar, P.H. 2008. Current and future therapeutic options in the management of invasive aspergillosis. *Drugs* 68(3): 265-282.
- Latgé, J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* 12:310-50.
- Latgé, J.P. 2003. "Annual report of *Aspergillus*". Disponible: <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2003/Aspergil-en.html> [date visited: 4/24/2001].
- Loffler, J., Hebart, H., Brauchie, U., Schumacher, U., Einsele, H. 2000. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* ADN by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10):3830-3833.

- Loeffler, J., Kloepfer, K., Hebart, H., Najvar, L., Graybill, J. R., Kirkpatrick, W. R., Patterson, T., F., Dietz, K., Bialek, R., Einsele, H. 2002. Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *The Journal of Infectious Diseases* 185:1203–1206.
- Maertens, J., Theunissen, K., Verbeken, E., Lagrou, K., Verhaegen, J., Boogaerts, M., Eldere, J.V. 2004. Prospective clinical evaluation of lower *cut-offs* for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cells transplant recipients. *British Journal of Hematology* 126:852-860.
- Maertens, J.A., Klont, R., Masson, C., Theunissen, K., Meersseman, W., Lagrou, K., Heinen, C., Crepin, B., Van Eldere, J., Tabouret, M., Donnelly, J.P., Verweij, P.E. 2007a. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases* 44(10):1329-1336.
- Maertens, J., Theunissen, K., Lodewyck, T., Lagrou, K., Van Eldere, J. 2007b. Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. *Mycoses* 50(1):2-17.
- Marr, K.A., Carter, R.A., Boeckh, M., Martin, P., Corey, L. 2002. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 100(13):4358-4366.
- Marr, K.A., Balajee, S.A., McLaughlin, L. 2004. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *The Journal of Infectious Disease* 190:641-649.
- Marr, K.A., Laverdiere, M., Gugel, A., Leisenring, W. 2005. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases* 40(12):1762-1769.
- Martino, R., Lopez, R., Sureda, A., Brunet, S., Domingo-Albós, A. 1997. Risk of reactivation of a recent invasive fungal infection in patients with hematological malignancies undergoing further intensive chemoradiotherapy: a single-center experience and review of the literature. *Hematologica* 82(3): 297-304.
- Marty, F.M., Rubin, R.H. 2006. The prevention of infection posttransplant: the role of prophylaxis, preemptive and empiric therapy. *Transplant International* 19(1):2–11.
- Maschmeyer, G., Link, H., Hiddemann, W. 1994. Pulmonary infiltrations in febrile patients with neutropenia: risk factors and outcome under empirical antimicrobial therapy in a randomized multicenter study. *Cancer* 73(9):2296-2304.

Maschmeyer, G., Haas, A., Cornely, O.A. 2007. Invasive aspergillosis: Epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs*. 67(11):15671-601.

Meersseman, W., Lagrou, K., Maertens, J., Wilmer, A., Hermans, G., Vanderschueren, S., Spriet, I., Verbeken, E., Wijngaerden, E. V. 2008. Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid: A Tool for Diagnosing Aspergillosis in Intensive Care Unit Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 177: 27-34.

Mennink-Kersten, M.A., Donnelly, J.P., Verweij, P.E. 2004. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases* 4(6):349-537.

Mennink-Kersten, M.A., Ruegebrink, D., Klont, R.R., Warris, A., Gavini, F., Op den Camp, H.J., Verweij, P.E. 2005. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *Journal of Clinical Microbiology* 43(8):3925-3931.

Mennink-Kersten, M.A., Ruegebrink, D., Wasei, N., Melchers, W.J., Verweij, P.E. 2006. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and ADN surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 44(5):1711-1718.

Muhlemann, K., Wenger, C., Zenhausem, R., Tauber, M.G. 2005. Risk factors for invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematologic malignancies. *Leukemia* 19(4):545-550.

Musher, B., Fredricks, D., Leisenring, W., Balajee, S.A., Smith, C., Marr, K.A. 2004. *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 42(12):5517-5522.

Odabasi, Z., Paetznick, V.L., Rodrigues, J.R., McGinnis, M.R., Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Medical Mycology* 44(3): 267-272.

Pagano, L., Caira, M., Candoni, A., Offidani, M., Fianchi, L., Martino, B., Pastore, D., Picardi, M., Bonini, A., Chierichini, A., Fanci, R., Caramatti, C., Invernizzi, R., Mattei, D., Mitra, M.E., Melillo, L., Aversa, F., Van Lint, M.T., Falcucci, P., Valentini, C.G., Girmenia, C., Nosari, A. 2006. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 91:1068-1075.

Panackal, A.A., Imhof, A., Hanley, E.W., Marr, K.A. 2006. *Aspergillus ustus* infections among transplant recipients. *Emerging Infectious Diseases* 12(3), 403-408.

Pasmans, H.L.M., Lossveld, O.J.L., Schouten, H.C., Thunnissen, F., van Engelshoven, J.M.A. 1992. Invasive aspergillosis in immunocompromised patients: findings on plain film and (HR) CT *European Journal of Radiology* 14: 37–40.

Paterson, D.L., Singh, N. 1999. Invasive aspergillosis in transplant recipients. *Medicine* 78(2): 123–138.

Patterson, T.F., Kirkpatrick, W.R., White, M., Hiemenz, J.W., Wingard, J.R., Dupont, B., Rinaldi, M.G., Stevens, D.A., Graybill, J.R. 2000a. Invasive Aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Aspergillus* Study Group. *Medicine (Baltimore)* 79(4): 250-260.

Patterson, J.E., Peters, J., Calhoun, J.H., Levine, S., Anzueto, A., Al-Abdely, H., Sanchez, R., Patterson, T.F., Rech, M., Jorgensen, J.H., Rinaldi, M.G., Sako, E., Johnson, S., Speeg, V., Half, G.A., Trinkle, J.K. 2000b. Investigation and control of aspergillosis and other filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transplant Infectious Disease* 2(1):22-8.

Péman, J. 2000. Diagnóstico de la aspergillosis invasiva. *Ver Iberoam Micol* 17: s90-s92.

Pfeiffer, C.D., Fine, J.P., Safdar, N. 2006. Diagnpsos of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: A meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 42:1417-1427.

Quindós, G. 2006. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycosis caused by filamentous fungi. *Clinical microbiology and infection* 12(7):40-52.

Reichenberger, F., Habicht, J., Kaim, A., Dalquen, P., Bernet, F., Schläpfer, R., Stulz, P., Perruchoud, A.P., Tichelli, A., Gratwohl, A., Tamm, M. 1998. Lung resection for invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients with hematologic diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158(3): 885-890.

Ruchel, R., Schaffrinski, M. 1999. Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor. *Journal of Clinical Microbiology* 37(8): 2694–2696.

Ruhnke, M., Bohme, A., Buchheidt, D., Donhuijsen, K., Einsele, H., Enzensberger, R., Glasmacher, A., Gumbel, H., Heussel, C.P., Karthaus, M., Lambrecht, E., Sudhoff, T., Szelényi, H. 2003. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology. *Annals of Hematology* 82(2):S141-S148.

Sanguinetti, M., Posteraro, B., Pagano, L., Pagliari, G., Fianchi, L., Mele, L., La Sorda, M., Franco, A., Fadda, G. 2003. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8):3922-3925.
Sharma, O.P., Chwogule, R. 1998. Many faces of pulmonary aspergillosis. *European Respiratory Journal* 12:705-715.

Sherif, R., Segal, B.H. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Wolters Kluwer Health* 2010; 16:242–250.

Singh, N., Paterson, D.L. 2005. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews* 18(1):44-69.

Singer, S., Singer, D., Ruchel, R., Mergeryan, H., Schmidt, U., Harms, K.. 1998. Outbreak of systemic aspergillosis in a neonatal intensive care unit. *Mycoses* 41(5 6):223–227.

Stephanie, P.M., Gottardi, M., Zanetti, F. 2006. Pre-emptive antifungal therapy among neutropenic patients. *Clinical Infectious Diseases* 42(10): 1507-1508.

Stevens, D.A., Kan, V.L., Judson, M.A., Morrison, V.A., Dummer, S., Denning, D.W., Bennett, J.E., Walsh, T.J., Patterson, T.F., Pankey, G.A. 2000. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*: Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 30(4):696–709.

Stynen, D., Goris, A., Sarfati, J., Latgé, J.P. 1995. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 33(2):497-500.

Sulahian, A., Touratier, S., Ribaud, P. 2003. False Positive Test for *Aspergillus* Antigenemia Related to Concomitant Administration of Piperacillin and Tazobactam. *The new england journal of medicine* 349(24):2366-2377.

Swanink, C.M., Meis, J.F., Rijs, A.J., Donnelly, J.P., Verweij, P.E. 1997. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection *Aspergillus* galactomannan. *Journal of Clinical Microbiology* 35(1):257-260.

Upton, A., Gugel, A., Leisenring, W., Limaye, A., Alexander, B., Hayden, R., Marr, K.A. 2005. Reproducibility of low galactomannan enzyme immunoassay index values tested in multiple laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 43(9):4796-4800.

Vallejo, C., Rovira, M. 2010. Profilaxis y tratamiento de la infección fúngica invasora en el paciente neutropénico. *Revista Espanola de Quimioterapia* 23(4): 177-183.

- Viscoli, C., Machetti, M., Cappellano, P., Bucci, B., Bruzzi, P., Lint, M.T.V., Bacigalupo. 2004. A False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clinical Infectious Diseases* 38:913-916.
- Wald, A., Leisenring, W., van Burik, J.A., Bowden, R.A. 1997. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *The Journal of Infectious Disease* 175:1459–1466.
- Walsh, T.J., Hiemenz, J., Pizzo, P.A. 1994. Evolving risk factors for invasive fungal infections: all neutropenic patients are not the same. *Clinical Infectious Diseases* 18(5): 793-798.
- Walsh, T.J., Shoham, S., Petraitiene, R., Sein, T., Schaufele, R., Kelaheer, A., Murray, H., Mya-San, C., Bacher, J., Petraitis, V.. 2004. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacilin-tazobactam and correlations between, in vitro, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *Journal of Clinical Microbiology* 42(10):4744-4748.
- Walsh, T.J., Anaissie, E.J., Denning, D.W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, K.A., Morrison, V.A., Segal, B.H., Steinbach, W.J., Stevens, D.A., van Burik, J.A., Wingard, J.R., Patterson, T.F. 2008. Infectious Diseases Society of America. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 46:327-360.
- Warnock, D.W., Hajjeh, R.A., Lasker, B.A. 2001. Epidemiology and prevention on invasive aspergillosis. *Hospital epidemiology* 3:507-516.
- Wheat, L.J. 2003. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transplant Infectious Disease* 5:158-166.
- Wheat, L.J. 2005. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter* 27(7): 51-57.
- Wheat, L.J. 2005. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter* 27: 59-63.
- Wiederhold, N.P., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P. 2003. Invasive Aspergillosis in Patients With Hematologic Malignancies. *Pharmacotherapy* 23(2): 1592-1610.
- Yeo, S.F., Wong, B. 2002. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3):465.484.