



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LUANA RAINERI DOS SANTOS

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ASPERGILOSE INVASIVA UTILIZANDO
MÉTODOS NÃO CULTURAIS PARA A DETECÇÃO DE *Aspergillus***

Florianópolis

2021

LUANA RAINERI DOS SANTOS

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ASPERGILOSE INVASIVA UTILIZANDO
MÉTODOS NÃO CULTURAIS PARA A DETECÇÃO DE *Aspergillus***

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos

Florianópolis

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUANA RAINERI DOS SANTOS

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ASPERGILOSE INVASIVA UTILIZANDO MÉTODOS NÃO CULTURAIS PARA A DETECÇÃO DE *Aspergillus*

O presente Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutica foi considerado adequado e aprovado em sua integralidade.

Florianópolis, 20 de setembro de 2021.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos

Xxxxxxx

Xxxxxxx

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar minha graduação, enfrentar todos os obstáculos e seguir meus sonhos.

Aos meus avós, Eloy e Gelmino, por acreditarem em mim, pelo amor incondicional deles comigo sempre nos melhores e piores momentos.

Aos meus pais Solange e Rogério pelo incentivo e carinho. As minhas irmãs Flávia e Kézia por serem minhas alegrias e inspirações diárias.

Gratidão imensa as minha amigas que fiz na graduação Duane, Angélica, Cintia, Carolina e Barbara que tornaram minha trajetória até aqui mais leve.

E aos meus professores por todos os ensinamentos, me permitindo crescimento profissional e poder chegar hoje ao final da graduação.

RESUMO

Os fungos são organismos muito comuns na natureza e apresentam potencial de colonização de diferentes superfícies da mucosa humana. Ao adentrarem essas mucosas, eles podem ser capazes de inibir os mecanismos de defesa do hospedeiro, levando a diversas patologias. As doenças fúngicas invasivas, especialmente a aspergilose invasiva (AI), causam uma grande parcela de morbidades e mortalidade entre crianças e adultos imunocomprometidos. O diagnóstico definitivo de AI é desafiador e requer a visualização do organismo no tecido ou sua detecção microbiológica em um compartimento estéril. Na prática clínica, o diagnóstico de AI é feito principalmente por estudos de imagem e biomarcadores de diagnóstico no sangue e amostras disponíveis. O objetivo do estudo foi realizar uma revisão sobre os métodos não culturais utilizados para a detecção de componentes do *Aspergillus* no diagnóstico laboratorial da aspergilose invasiva. A busca por estudos foi realizada nas bases de dados Scielo e PubMed, e no Google Acadêmico, publicações em livros, dissertações e teses. Foram considerados os artigos publicados entre janeiro de 2011 a dezembro de 2021. Métodos não baseados em cultura são fundamentais para um diagnóstico rápido de doenças fúngicas invasivas e incluem ensaios baseados na detecção de antígenos fúngicos, galactomanana, dispositivo de fluxo lateral, reação em cadeia da polimerase, entre outros). Esses testes são geralmente aplicados ao diagnóstico de AI e outras condições, alguns com desempenho único efetivo, outros com excelentes resultados quando combinados entre si. A acurácia diagnóstica dos métodos não culturais tem sido muito investigada ao longo dos anos, e os autores destacam as suas elevadas especificidades e sensibilidades. Muitos deles com custos baixos e facilidade de acesso em laboratórios diversos.

Palavras-chave: *Aspergillus spp.* Aspergilose invasiva. Diagnóstico. Métodos não culturais.

ABSTRACT

Fungi are very common in nature and have the potential to colonize different surfaces of the human mucosa. When entering these mucous membranes, they are able to avoid the host's defense mechanisms. Invasive fungal diseases, especially invasive aspergillosis, cause a large portion of morbidity and mortality among immunocompromised children and adults. Definitive diagnosis of IA is challenging and requires visualization of the organism in tissue or its microbiological detection in a sterile compartment. In daily clinical practice, the diagnosis of IA is primarily made by appropriate imaging studies and diagnostic biomarkers in blood and other available specimens. The aim of the study was to review scientific articles on non-cultural methods used to detect *Aspergillus* components in the laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. A narrative review was carried out, aiming to identify published data on the non-culture-based diagnosis of *Aspergillus*, in order to generate greater clarification regarding different methods that can be applied for this purpose. Bibliographical research was carried out in the portals of the periodicals Capes, Scielo Brasil and PubMed, Google Academic, publications in books, dissertations and theses. The research interval comprised the period between 2011 and 2021. Non-culture-based methods are essential for a rapid diagnosis of invasive fungal diseases and include assays based on the detection of fungal antigens (GM, lateral flow device, PCR, among others). These tests are generally applied to the diagnosis of IA and other conditions, some with unique effective performance, others with excellent results when combined with each other. Non-cultural methods have been more commonly evaluated over the years, with the authors believing that they have high specificity and sensitivity, many of them with low costs and easy access in different laboratories.

Keywords: *Aspergillus* spp. Invasive Aspergillosis. Diagnosis. Non-culture methods.

LISTA DE ABREVIATURAS

AI – Aspergilose Invasiva;

BDG - B-D-GLUCANA;

GM – Galactomanana;

LBA – Lavado Broncoalveolar;

LFD - Dispositivo de Fluxo Lateral;

MALDI-TOF MS - Espectrometria de Massa por Tempo de Voo –
Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz;

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aspergillus</i> spp. ao microscópio óptico	13
Figura 2. Cultura de <i>Aspergillus</i> spp.	17
Figura 3. Exames de imagens de aspergilose invasiva (API).....	20
Figura 4. Exames de imagem de tórax na recuperação.....	20
Figura 5. Método MALDI-TOF MS.....	27
Figura 6. Seleção dos estudos	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de diagnóstico.....	22
---------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA	11
1.2 OBJETIVOS	11
1.2.1 OBJETIVO GERAL	11
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>ASPERGILLUS</i> SPP.	13
2.2 <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	16
2.3 ASPERGILOSE INVASIVA (AI).....	18
2.4 GALACTOMANANA (GM).....	23
2.5 1,3 B-D-GLUCANA (BDG).....	24
2.6 DETECÇÃO GENÔMICA PARA <i>ASPERGILLUS</i>	25
2.7 MALDI-TOF MS.....	26
3 METODOLOGIA	28
3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE PUBLICAÇÕES	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos muito comuns na natureza e apresentam potencial colonização de diferentes superfícies da mucosa humana. Ao adentrarem essas mucosas, muitas vezes, os fungos são capazes de inibir os mecanismos de defesa imune do hospedeiro. Nos casos em que a resposta imunológica está prejudicada, como em imunocomprometidos, esses organismos podem invadir áreas normalmente estéreis do corpo humano, causando infecções graves. Ainda, muitas vezes são de difícil diagnóstico e tratamento, podendo ser potencialmente letais. Dados apontam que infecções fúngicas invasivas são comuns na prática clínica, com maior incidência de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (ARVANITIS *et al.*, 2014).

Doenças fúngicas invasivas, especialmente aspergilose invasiva (AI), causam uma grande parcela de morbidades e mortalidade entre crianças e adultos imunocomprometidos (LEHRNBECHER *et al.*, 2018). A capacidade de tratar efetivamente essas infecções depende diretamente do diagnóstico precoce, bem como da identificação das espécies presentes em cada hospedeiro. Todavia, os métodos de diagnóstico padrão atuais estão longe de ser adequados. Assim, muitos pesquisadores tem investigado alternativas para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas, como os métodos sorológicos e, principalmente, os moleculares (ARVANITIS *et al.*, 2014).

O diagnóstico definitivo de AI é desafiador e requer a visualização do organismo no tecido ou sua detecção microbiológica em um compartimento estéril. Na prática clínica, o diagnóstico de AI é feito principalmente por estudos de imagem e biomarcadores de diagnóstico no sangue e outras amostras. Esses métodos são essenciais para a tomada de decisões sobre a escolha do antifúngico e da duração da terapia (LEHRNBECHER *et al.*, 2018).

Existem diferentes testes que estão em estudos e apresentam bons resultados no que tange um diagnóstico mais efetivo, sendo que os métodos não baseados em cultura vêm se tornando mais comuns e constantes na prática clínica em todo o mundo (PATTERSON *et al.*, 2016).

1.1 JUSTIFICATIVA

As Infecções fúngicas invasivas são uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com distúrbios onco-hematológicos, câncer, transplantados, portadores HIV/AIDS, e pacientes em terapia com agentes imunossupressores. A deficiência ou falha da imunidade favorece a disseminação do agente infeccioso e, conseqüentemente, infecções mais graves sendo o óbito um desfecho relativamente comum entre esses pacientes (COSTA, 2015).

O aumento da taxa de mortalidade decorre, em parte, devido a tratamentos inadequados, a resistência aos agentes antifúngicos, diagnóstico tardio, ou o não diagnóstico devido à falta de testes suficientemente sensíveis para detecção fúngica (COSTA, 2015).

Assim, o diagnóstico de infecções fúngicas depende de uma combinação de observações clínicas e laboratoriais, de modo que quanto mais precocemente for diagnosticada a AI, melhor será o prognóstico e o sucesso da terapia ao paciente. Nesta revisão de literatura, foram descritos os métodos de diagnóstico não culturais utilizados para o diagnóstico da AI nos laboratórios de análises clínicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão de artigos científicos sobre métodos não culturais utilizados para a detecção de componentes do *Aspergillus*, no diagnóstico laboratorial da aspergilose invasiva.

1.2.2 Objetivos específicos

Identificar os métodos não culturais utilizados para diagnóstico de infecção humana por *Aspergillus*;

Relatar testes baseados em detecção de galactomanana específica para *Aspergillus*;

Relatar testes baseados em detecção de glucana não-específica para *Aspergillus*;

Comentar as publicações para detecção genômica para *Aspergillus* sp;

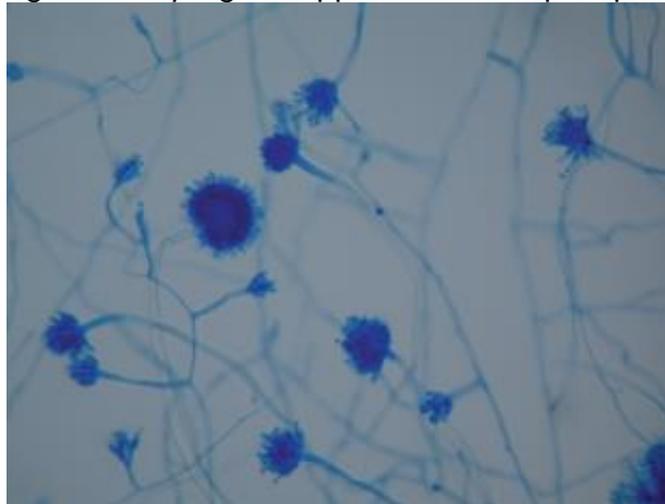
Comentar as publicações sobre a técnica MALDI-TOF para identificação de *Aspergillus* sp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aspergillus* spp.

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez pelo biólogo italiano, Pietro Micheli em 1729. O nome *Aspergillus* vem da sua forma quando observado ao microscópio, parecendo-se com um *aspergillum* que é conhecido como um instrumento litúrgico usado para borrifar água benta.

Figura 1. *Aspergillus* spp. ao microscópio óptico



Fonte: Gomes *et al.* (2015).

Dentro do gênero *Aspergillus* encontram-se centenas de fungos oportunistas que podem viver em condições muito variadas. Apresentam aspecto filamentosos e povoam o solo, a vegetação em decomposição, sementes e grãos, em vida saprofítica. Em algumas situações as espécies de *Aspergillus* podem causar impactos negativos sobre a saúde dos humanos. Apenas algumas espécies são bem conhecidas e destacadas como patógenos oportunistas com impactos importantes na vida de humanos (MOUSAVI *et al.*, 2016).

Por estarem amplamente espalhadas pelo ambiente, as espécies de *Aspergillus* estão constantemente em contato com os indivíduos e animais, porém, não se concentram apenas no ambiente natural, residências, eletrodomésticos, roupas, todos esses locais podem ser locais de desenvolvimento desses fungos (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

A taxonomia polifásica teve um grande impacto nos conceitos de espécies do gênero *Aspergillus*. O gênero, após amplos estudos, foi subdividido em 22 seções

distintas. Dentre elas, *Aspergillus*, *Fumigati*, *Circumdati*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Ornati*, *Warcupi*, *Candidi*, *Restricti*, *Usti*, *Flavipedes* e *Versicolores* são aquelas que contam com espécies clinicamente relevantes. Embora existam mais de 200 espécies conhecidas no gênero, apenas um pequeno número delas está associado a infecções em humanos (MOUSAVI *et al.*, 2016).

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem à família das *Aspergillaceae*, à classe *Ascomycetos* e à subclasse *Euascomycetae*. O gênero *Aspergillus* possui várias espécies que podem causar doenças em humanos, sendo os mais frequentemente isolados: *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* e, com maior predomínio a espécie *Aspergillus fumigatus* (CARVALHO, 2013).

A contaminação resultante por esses fungos pode ser severa, fazendo com que haja uma crescente preocupação com o seu potencial patogênico e estudos se concentram em compreender suas especificidades e encontrar formas de atuar para que o potencial de adoecimento seja compreendido, devidamente diagnosticado e medidas de manejo efetivas sejam adotadas (MOUSAVI *et al.*, 2016).

Como podem se propagar pelo ar, configuram-se como uma ameaça a todos que estão nos locais de sua presença, mas algumas pessoas irão adoecer e outras não, em função de suas condições de saúde. Os fungos enquadram-se nessas espécies e podem causar desde alergias leves, asma e infecções severas. Ambientes hospitalares são locais com grande presença de *Aspergillus*, assim como plantas usadas no interior de habitações e empresas podem levar ao seu maior desenvolvimento (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

O fato é que pacientes com comprometimentos do sistema imune possuem maior risco de óbito caso ocorra infecção pelas espécies de *Aspergillus*. Como as populações de maiores riscos pode-se citar pacientes submetidos a transplantes de órgãos, com imunodeficiências genéticas ou adquiridas (como a AIDS), pacientes em tratamento oncológico, em uso de corticosteroides, entre tantos outros (PATTERSON *et al.*, 2016).

Bandres, Modi e Sharma (2021) afirmam que o sistema imune é essencial tanto para o reconhecimento de fungos inalados, quanto para o controle do crescimento e regulação da resposta alérgica ou inflamatória do corpo à infecção. Assim, o comprometimento do sistema imunológico permite que esses

fungos sejam aspirados e o organismo não tenha as devidas condições para evitar que se espalhem e causem patologias.

Esses fungos estão presentes no meio ambiente, em solos, folhas mortas, material orgânico em decomposição, conseguindo sobrevivendo a várias condições ambientais. As infecções causadas por esses fungos variam desde uma reação alérgica, com inflamação local, até uma infecção grave com comprometimento de diferentes órgãos, isso tudo dependendo do sistema imune do hospedeiro e a virulência do fungo (BARBOSA *et al.*, 2019).

Recentemente ocorreram avanços consideráveis nos métodos de diagnóstico, todavia, é preciso ressaltar que o diagnóstico segue sendo visto como amplamente desafiador. Considerando a natureza inespecífica da apresentação clínica, a falta de um ensaio sensível e preciso para garantir um diagnóstico precoce, bem como o fato de que os *Aspergillus* patogênicos raramente são isolados de pessoas infectadas (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

Os ensaios baseados em cultura apresentam como vantagem a obtenção de isolados clínicos para investigação epidemiológica e para a pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. No entanto, uma cepa de *Aspergillus* isolada de um paciente infectado pode ou não ser o principal agente causal da infecção de aspergilose em outro paciente, pois várias cepas de fungos, algumas altamente patogênicas e outras não, podem estar envolvidas (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

Diversos testes imunológicos tem sido empregados para o diagnóstico da aspergilose. Os ensaios baseados na detecção de anticorpos apresentou bons resultados para o diagnóstico de aspergilose alérgica e aspergiloma. Os ensaios para detecção de antígenos fúngicos mostraram importante potencial no diagnóstico de AI. Como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que permite o diagnóstico precoce da aspergilose. As vantagens dos testes moleculares incluem a alta sensibilidade, capacidade de estabelecer diagnóstico em nível de espécie e cepa, e ainda, a capacidade de detectar genes que conferem resistência antifúngica (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

O método PCR é relativamente rápido, econômico e pode ser aplicada em diversos tipos de amostra, como sangue, escarro e tecido. Todavia, esses métodos ainda não encontraram seu lugar na prática clínica principalmente devido à falta de padronização e reprodutibilidade. Ainda, a aplicação de PCR exige que um cuidado especial seja tomado para evitar resultados falso-positivos, por exemplo, aqueles

causados por contaminação cruzada por conídios comumente presentes no ar e nas vias aéreas de pacientes não infectados. O método de PCR deve ser usado em conjunto com outros métodos, como ensaios sorológicos ou métodos radiológicos, para diagnosticar a aspergilose (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

As ferramentas moleculares devem ter seu uso expandido nos laboratórios, porém, até que isso ocorra as amostras devem ser recolhidas e enviadas em quantidades adequadas para que sejam submetidas a exames histopatológicos/citológicos e de cultura simultâneos. No caso de isolados com crescimento atípico ou preocupações com resistência, a identificação das espécies por métodos moleculares deve ser empregada (PATTERSON *et al.*, 2016).

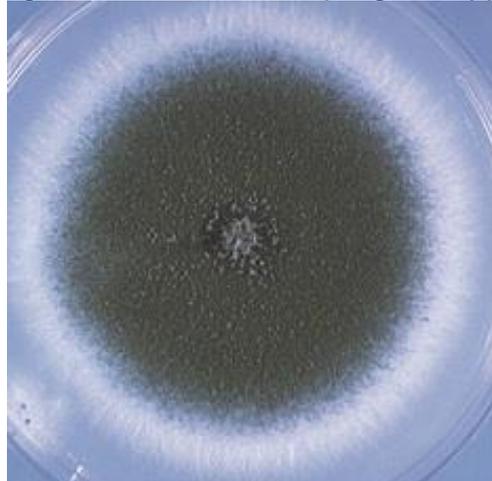
Aspergillus fumigatus é responsável por uma parte importante das infecções e será avaliado a seguir.

2.2 *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus pertence à família *Trichocomaceae*, sendo descrita pela primeira vez em 1863 pelo médico Georg W. Fresenius. Seu nome é derivado do latim *fumigave*, que significa fumaça referindo-se ao micélio azul-cinza esfumaçado (CARVALHO, 2013).

A. fumigatus é um fungo que apresenta genoma haploide estável de 29,4 milhões de pares de bases. O ciclo de vida fora do hospedeiro humano ocorre pela reprodução assexuada, dando origem a conidióforos, estruturas nas quais a forma infecciosa conhecida como conídios é produzida e liberada no ar. Os conídios são responsáveis pela dispersão dos fungos e preservação do genoma do fungo em condições adversas. Existem centenas de conídios inalados por humanos todos os dias e a prevalência das espécies apresentou alterações na última década. *A. fumigatus* costumava causar 90% das infecções, porém, recentemente foi demonstrado que *A. fumigatus* responde por aproximadamente 60% das infecções, seguidas em frequência por *A. flavus*, *Aspergillus niger* e *A. terreus* (BANDRES; MODI; SHARMA, 2021).

Figura 2. Cultura de *Aspergillus spp.*



Fonte: Mycoloy Online (2021).

Os conidióforos produzidos por *A. fumigatus* são hialinos, de parede lisa, com vesícula em forma de balão. As cabeças conidiais (ou vesículas) são colunares, unisseriadas, apresentando uma fila única de fiáldes. Seus esporos são produzidos em conidióforos especializadas que variam de 1,0 μm a 3,0 μm de diâmetro e são depositados no trato respiratório inferior. O aspecto macroscópico das colônias de *A. fumigatus*, geralmente tem um aspeto aveludado, de coloração cinza-esverdeada ou cinza-azulada (CARVALHO, 2013).

A. fumigatus é termotolerante, comparado a outros fungos desta espécie, crescendo em temperaturas variando entre 15°C a 53°C (BARBOSA *et al.*, 2019). Esta espécie é responsável por aproximadamente 90% das aspergiloses invasivas diagnosticadas em seres humanos (CARVALHO, 2013).

A. fumigatus acomete tanto animais como seres humanos que apresentam o sistema imune debilitado, como nos portadores de HIV/AIDS, neoplasias, lúpus, após transplantes, e naqueles submetidos a quimioterapia (BARBOSA *et al.*, 2019). O fungo tem a capacidade de invadir o organismo pelas vias respiratórias, se alojando nos seios paranasais e, posteriormente, tomando conta das vias aéreas inferiores. Pode se disseminar para outros órgãos como rins, olhos, ossos, sistema cardiovascular e sistema nervoso central (BARBOSA *et al.*, 2019).

Infecções pulmonares causadas por *A. fumigatus* decorrem da inalação de conídios transportados pelo ar. Essas estruturas estão comumente presentes em ambientes internos e externos em concentrações que variam entre 1 e 100 conídios por m^3 , mas podem atingir até 10^8 conídios por m^3 em certos ambientes. Diante disso, é bastante frequente o isolamento de *Aspergillus spp.* de culturas do trato

respiratório de pacientes assintomáticos sem evidência de doença invasiva ou alérgica. O DNA de *Aspergillus* é encontrado em 37% das amostras de biópsia pulmonar de adultos saudáveis e em até 30% dos pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

A colonização por *Aspergillus* nem sempre está associada à infecção, porém, eleva o risco de desenvolvimento de infecção invasiva em indivíduos imunocomprometidos (LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

2.3 ASPERGILOSE INVASIVA (AI)

A aspergilose invasiva foi descrita pela primeira vez em 1953 por Rankin. A aspergilose pulmonar invasiva acontece quando o fungo consegue se multiplicar nos pulmões, as hifas invadem o lúmen e a parede dos vasos sanguíneos, podendo se espalhar para outros órgãos (BARBOSA *et al.*, 2019).

A condição tem constituído um problema grave em diversos grupos de doentes imunocomprometidos causando altas taxas de mortalidade (CARVALHO, 2013). Essa é uma infecção progressiva, aguda e severa, de mau prognóstico, que pode ser fatal. Os sintomas são inespecíficos, variando entre febre, com infiltrados pulmonares acompanhados de dor torácica e hemoptise em pacientes neutropênicos. Embora exista terapia antifúngica específica, a taxa de mortalidade é bastante elevada, normalmente superando os 70% dos casos (CARVALHO, 2013). E ainda, a incidência de aspergilose invasiva quadruplicou nos últimos 13 anos (VUOGN; WAYMACK, 2021).

A aspergilose invasiva é uma condição com casos mais prevalentes entre indivíduos que apresentam alguma forma de imunocomprometimento, especialmente em casos mais severos como AIDS, neutropenia, uso de corticosteroides em longo prazo e receptores de transplantes que recebem medicamentos para evitar a rejeição dos órgãos. A incidência de aspergilose em pacientes que passaram por transplante de medula óssea varia de 10% a 20% dos casos (VUOGN; WAYMACK, 2021). A condição também ocorre entre pacientes em estado crítico, submetidos à terapia intensiva, que apresentem doença pulmonar subjacente, como DPOC ou asma. A aspergilose broncopulmonar alérgica ocorre quase que exclusivamente em pacientes com asma e fibrose cística (VUOGN; WAYMACK, 2021).

Destaca-se que a aspergilose invasiva é mais comum entre indivíduos com imunossupressão severa, especialmente em casos de malignidades hematológicas e transplantes. É caracterizada por invasão de hifas através dos tecidos brônquicos ou das vias aéreas inferiores, com potencial invasão vascular e achados radiográficos marcantes que refletem hemorragia e necrose. As espécies de *Aspergillus* causam uma gama mais ampla de doenças pulmonares, patologicamente caracterizadas por doenças inflamatórias nas vias aéreas e invasão aguda e crônica, em grande parte associadas aos riscos do hospedeiro (MARR *et al.*, 2021).

A aspergilose invasiva é difícil de ser diagnosticada precocemente, devido sintomas serem comuns aos de outras infecções, e o uso de medicamentos que diminuem o crescimento fúngico podem afetar a sua detecção e isolamento, assim como, alguns testes laboratoriais empregados apresentam pouca sensibilidade e especificidade. Para a confirmação do diagnóstico de AI, é considerado o conjunto de exames de imagens (raio-X, tomografia, ressonância), laboratoriais (exames histopatológicos, imunológicos e cultura), assim como anamnese de sinais, sintomas e histórico clínico do paciente (CARVALHO, 2013).

Imbert *et al.* (2018) enfatizam a dificuldade de diagnóstico de AI, e afirmam que ainda é comum seguir critérios clínicos, radiológicos e micológicos, baseando-se em dados publicados nas diretrizes Europeias de diagnóstico. Assim, existe uma necessidade urgente de novos métodos laboratoriais que possam gerar agilidade no diagnóstico da AI, permitindo o tratamento precoce e elevando as chances de um prognóstico favorável para esses pacientes.

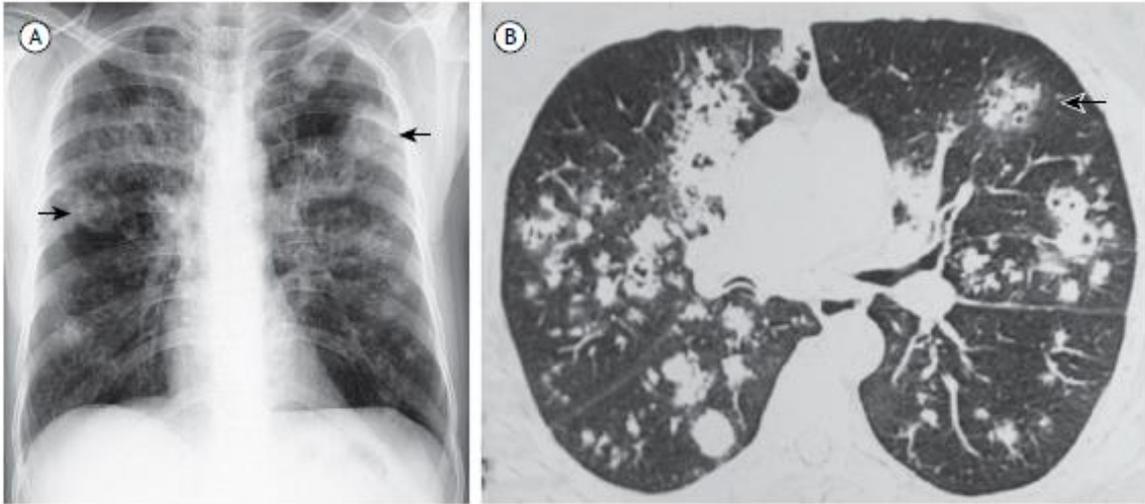
Devido a elevada taxa de diagnóstico tardio, algumas técnicas laboratoriais mais específicas para o diagnóstico da AI tem sido desenvolvidas. Como por exemplo, os imunoenaios utilizados para a detecção de antígenos de *Aspergillus* spp., que permitem a detecção precoce da infecção o que favorece um melhor prognóstico para os pacientes. Esses testes também têm auxiliado na monitorização da doença (CARVALHO, 2013).

A AI ocorre de forma mais comum nos pulmões, porém, é capaz de disseminar-se para outros órgãos e, assim, os sinais e sintomas dependem dos órgãos atingidos e grau de comprometimento. Dentro os sinais, pode ocorrer tosse, hemoptise, dispneia, dor torácica, lesões cutâneas ou sintomas neurológicos. A patogênese, sinais e sintomas, a apresentação radiológica e o desempenho do teste

diagnóstico são questões que diferem muito entre pacientes com e sem neutropenia (JENKS; HOENIGL, 2018).

Para melhor compreensão dos aspectos da aspergilose invasiva, apresenta-se a Figura 3, na sequência.

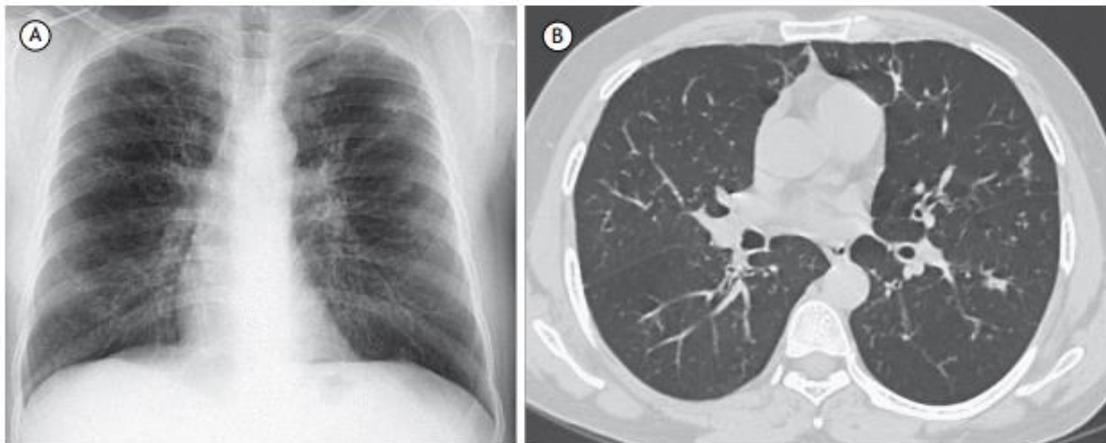
Figura 3. Exames de imagens de aspergilose invasiva (API).



Fonte: Gera *et al.* (2015).

Legenda: A) Radiografia de tórax, realizada após o início dos sintomas de API, mostrando consolidações multifocais bilaterais com cavitação em algumas das lesões (setas); B) Tomografia computadorizada de alta resolução do tórax (TCAR) de tórax, realizada uma semana após o início dos sintomas, mostrando múltiplas áreas de consolidação bem como lesões nodulares (seta).

Figura 4. Exames de imagem de tórax na recuperação



Fonte: Gera *et al.* (2015).

Legenda: Radiografia de tórax (A) e TCAR de tórax (B), ambas realizadas após dois meses de tratamento com itraconazol mostrando melhora das lesões, com algumas fibroses residuais

A febre ocorre em 95% dos pacientes de AI com neutropenia, porém, se manifesta em somente as 50% a 70% dos pacientes não neutropênicos. Tosse e dor

torácica podem ser menos frequentes em pacientes não neutropênicos. Como consequência, a AI permanece difícil de diagnosticar, principalmente em pacientes não-neutropênicos, entre os quais a apresentação clínica e os sinais radiológicos são atípicos. Portanto, o diagnóstico é frequentemente tardio e a condição permanece associada a altas taxas de mortalidade (JENKS; HOENIGL, 2018).

Como não existe um teste considerado padrão ouro para o diagnóstico de AI, diferentes ensaios micológicos são realizados e combinados com métodos clínicos, radiológicos e histológicos. As abordagens de diagnóstico micológico para a condição incluem: cultura de fungos de lavado brônquio alveolar - LBA e biópsias; imunodeteção do componente da parede celular galactomanana (GM) no soro, LBA e urina; detecção do componente da parede celular 1,3- β -d-glucano (BDG) via ativação do fator G no soro; detecção de sideróforos específicos de *Aspergillus* em LBA ou urina; detecção de proteínas de parede celular específica de *Aspergillus* por meio de um teste de dispositivo de fluxo lateral (LFD) e detecção de DNA específico de *Aspergillus* via reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue e LBA (JENKS; HOENIGL, 2018).

Barton (2013) esclarece que o diagnóstico de AI é complicado tendo-se em vista que diferente de muitas infecções, a hemocultura quase sempre é negativa para *A. fumigatus* e a amostragem LBA para o fungo também é insensível. Consolidou-se uma falta de ferramentas de diagnóstico que gerou inúmeros estudos e testes de abordagens diagnósticas não culturais, como exames de imagem, PCR e detecção de antígenos, especialmente a detecção de galactomanana no soro e LBA.

Um fator que reduz a sensibilidade de todos os testes de diagnóstico para AI, incluindo cultura, GM, PCR e LFD é a profilaxia ou tratamento antifúngico ativo para fungos em andamento. Dadas as sensibilidades reduzidas de todos os testes de diagnóstico disponíveis em pacientes que recebem antifúngicos ativos para fungos, a combinação de vários testes de diagnóstico e biomarcadores de LBA e sangue é a abordagem atualmente recomendada e demonstra um aumento significativo de sensibilidades, enquanto especificidades foram apenas ligeiramente reduzidas (JENKS; HOENIGL, 2018).

As combinações mais promissoras incluem PCR e/ou LFD específico de *Aspergillus* e/ou GM de LBA com GM sérico. Além disso, verificou-se que a combinação com a detecção de níveis muito elevados de interleucina 8 sérica, é

altamente sensível e específica quando combinada com lavado brônquio alveolar LFD ou PCR (JENKS; HOENIGL, 2018) (Tabela 1).

IL-8 atua na resposta imune inata, macrófagos (INF), os monócitos na resposta imune celular adaptativa, controlando o fungo.

Os critérios diagnósticos incluem a presença de sintomas respiratórios e / ou constitucionais por pelo menos três meses, anormalidades sugestivas em exames de imagem e evidência sorológica ou microbiológica de *Aspergillus*. Para evidências micológicas, o IgG específico para *Aspergillus* tem um papel central, enquanto os testes para crescimento invasivo, incluindo GM, são principalmente negativos (JENKS; HOENIGL, 2018).

A Tabela 1 fornece uma visão sumarizada dos métodos de diagnóstico, os espécimes e a sensibilidade.

Tabela 1. Métodos de diagnóstico

Teste	Espécime	Sensibilidade (%)
Cultura	Espécimes respiratórios	11,8-81,0
β-D-glucano	Soro	15,4-26,7
	LBA	77,8
Galactomanana	Soro	22,6-66,7
	LBA	77,2-77,8
Anticorpo precipitante de <i>Aspergillus</i>	Soro	56-89,3
Anticorpo <i>Aspergillus</i> IgG	Soro	93,2
		83,8-98
		92,9-96
		84,2-90
		77
		75
PCR	LBA	67-87

LBA lavado broncoalveolar .

Fonte: Adaptado de Takazono e Izumikawa (2018).

Os principais marcadores para o diagnóstico preciso são destacados na sequência.

2.4 GALACTOMANANA (GM)

A galactomanana (GM) é um heteropolissacarídeo termoestável que está presente na parede do *Aspergillus*, sendo liberada durante o crescimento da hifa no tecido que é infectado. A molécula tem uma imunogênica manana com sítios imunorreativos contendo unidades de galactofuranose (SALES, 2009).

Cada espécie fúngica possui GM com propriedades químicas diferentes entre si. A GM é um biomarcador que contribuiu para diagnóstico da aspergilose invasiva (AI), uma vez que o antígeno é liberado na circulação sanguínea durante o crescimento das hifas nos tecidos do hospedeiro. Ainda, por ser hidrossolúvel, o antígeno pode ser encontrado em diferentes amostras clínicas, como no soro, urina, líquido cefalorraquidiano, líquido pericárdio e lavado broncoalveolar (SALES, 2009).

A abordagem não baseada em cultura mais comumente usada para o diagnóstico de AI é a detecção de GM no soro e em LBA. Em contraste com a detecção de GM em LBA, o desempenho da GM sérico é fortemente influenciado pelo estado de neutrófilos do hospedeiro com sensibilidades acima de 60% a 70% em pacientes neutropênicos com crescimento angioinvasivo, mas as sensibilidades são frequentemente 20% em pacientes não neutropênicos com crescimento invasivo das vias aéreas (JENKS; HOENIGL, 2018).

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar a acurácia da GM no LBA, entretanto, ainda há várias controvérsias em relação ao ponto de corte ideal (BRANDÃO, 2012). Ainda que sejam menos amostradas devido à sua capacidade de invasão, as amostras respiratórias, como LBA são relevantes no diagnóstico de AI. Diretrizes europeias recomendam, atualmente, o uso de galactomanana no Lavado Brônquio Alveolar como um critério micológico para diagnóstico da AI (IMBERT *et al.*, 2018).

A cinética de liberação da GM ainda não é bem conhecida, sabe-se que fatores como o estado imunológico do hospedeiro, sítio da infecção, fase de crescimento do fungo, podem influenciar na concentração de GM liberada. Assim, quanto mais GM é detectada no tecido infectado, maior é o crescimento fúngico, mesmo que o paciente não tenha sinais clínicos da infecção (ROCHA, 2018).

Atualmente, no mercado, encontram-se vários métodos de diagnóstico de GM como: aglutinação em látex, radioimunoensaio, ELISA por inibição da absorbância e ELISA "sanduíche". Sendo essa última a técnica mais promissora, por ser a mais

sensível, detectando baixas concentrações de GM, além de fornecer resultados rápidos, em poucas horas e não sendo invasivo (BRANDÃO, 2012).

Obter o espécime histopatológico pode ser difícil, já que existem pacientes que não toleram procedimentos diagnósticos invasivos, como biópsia pulmonar transbrônquica, em função do estado geral. Nesses casos, o sorodiagnóstico é imprescindível para o diagnóstico. Os ensaios de galactomanana (GM) no soro e no líquido do lavado alveolar brônquico apresentam alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico, com valores de corte de 0,5 e 1,0, respectivamente. O antígeno GM no lavado alveolar brônquico apresenta sensibilidade importante, de 77,2% e especificidade de 77,0%, com valor de corte de 0,4, do que no soro (TAKAZONO; IZUMIKAWA, 2018).

2.5 1,3 B-D-GLUCANA (BDG)

Assim como a galactomanana, a β -D-glucana também é um polissacarídeo presente na parede celular do fungo que é liberado durante seu crescimento. BDG pode ser utilizada no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas, que consiste na detecção sérica ou plasmática (CORDOVA *et al.*, 2016).

Ao contrário do GM, o BDG é um componente da célula paredes de muitos fungos patogênicos, incluindo *Candida*, *Fusarium* e *Pneumocystis*, não sendo possível diferenciar as diferentes espécies de fungos com a utilização deste marcador. Assim, devido ser detectado em uma grande variedade de espécies fúngicas, este método acaba falhando no estabelecimento de um diagnóstico específico, como a API, servindo apenas na constatação de que há uma infecção fúngica estabelecida (CORDOVA *et al.*, 2016).

As paredes celulares do *Aspergillus* carregam importantes quantidades de glucano, dos quais 1,3 β -D-glucano é bastante prevalente. Na análise *in vitro* do crescimento de *A. fumigatus* ficou evidenciado que assim como GM, o BDG é liberado durante o crescimento fúngico, embora isso ocorra um pouco mais tarde. Ao contrário do que ocorre com GM, o BDG é muito comum no reino fúngico e está presente nas paredes celulares de muitos fungos patogênicos. Semelhante ao GM, o BDG é excretado no fluido de cultura de *A. fumigatus* (BARTON, 2013).

O ensaio de β -D-glucana (BDG) apresenta alta sensibilidade para o rastreamento de variadas infecções fúngicas invasivas, como candidemia,

pneumonia pneumocística e AI, porém, a especificidade é limitada. A combinação de ensaios de GM e BDG em lavado brônquio alveolar tem maior precisão diagnóstica em comparação com outros métodos de diagnóstico simples ou combinações (TAKAZONO; IZUMIKAWA, 2018).

2.6 DETECÇÃO GENÔMICA PARA *Aspergillus*

A reação de cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a detecção do DNA do fungo em amostras biológicas por meio da replicação *in vitro* de uma sequência alvo característica do microrganismo (CORDOVA *et al.*, 2016).

Há mais de duas décadas, a PCR tem sido utilizada para o diagnóstico da AI. O teste de PCR de *Aspergillus* na amostra de sangue apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes para o diagnóstico de AI. Na amostra LBA, a PCR apresenta sensibilidade tolerável, entre 66,7 e 86,7%, bem como especificidade de 84,2% a 94,2% em comparação com GM ou BDG. Seu aspecto quantitativo oferece a possibilidade de estabelecer valores de corte precisos que poderiam distinguir colonização de infecções ativas, além de detectar RNA, um indicador de células fúngicas vivas (TAKAZONO; IZUMIKAWA, 2018).

A detecção de *Aspergillus* a partir de amostras de sangue, aplicando-se o método de PCR não é uma prática recente e dados apontam para sua contribuição no esforço de diagnóstico da AI, especialmente em pacientes neutropênicos e não neutropênicos. O método conta, ainda, com boa capacidade preditiva para o desfecho da doença (IMBERT *et al.*, 2018).

Apesar de ser uma técnica rápida, de baixo custo, de fácil execução e possuir resultados com bons índices de sensibilidade e especificidade, a utilização da PCR como método diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva ainda não é considerada um método de rotina pelo fato de não possuir um procedimento comercial padronizado. (CORDOVA *et al.*, 2016). O teste de PCR de *Aspergillus* também é praticável em amostras de LAB, não apenas sanguíneas e é preciso buscar mais informações sobre sua potencial utilidade (IMBERT *et al.*, 2018).

Um grande benefício da utilização de PCR é que, embora a GM não consiga identificar espécies infectantes de *Aspergillus*, a PCR poderia ser adaptada para

identificação da espécie e também possivelmente inferir padrões gerais de susceptibilidade antifúngica (CORDOVA *et al.*, 2016).

Barton (2013) afirma que a grande vantagem da detecção molecular é que existe um elemento de amplificação do sinal de *Aspergillus* de modo que o método tem uma sensibilidade potencialmente alta. Além disso, os métodos de PCR para a detecção de DNA fúngico também podem ser adaptados para detectar praticamente todos os fungos ou membros do gênero *Aspergillus*. Como muitas infecções virais são atualmente diagnosticadas por métodos baseados em PCR, a tecnologia e o conhecimento estão aumentando e fazem parte da maioria dos laboratórios clínicos, com custos que vêm caindo.

2.7 MALDI-TOF MS

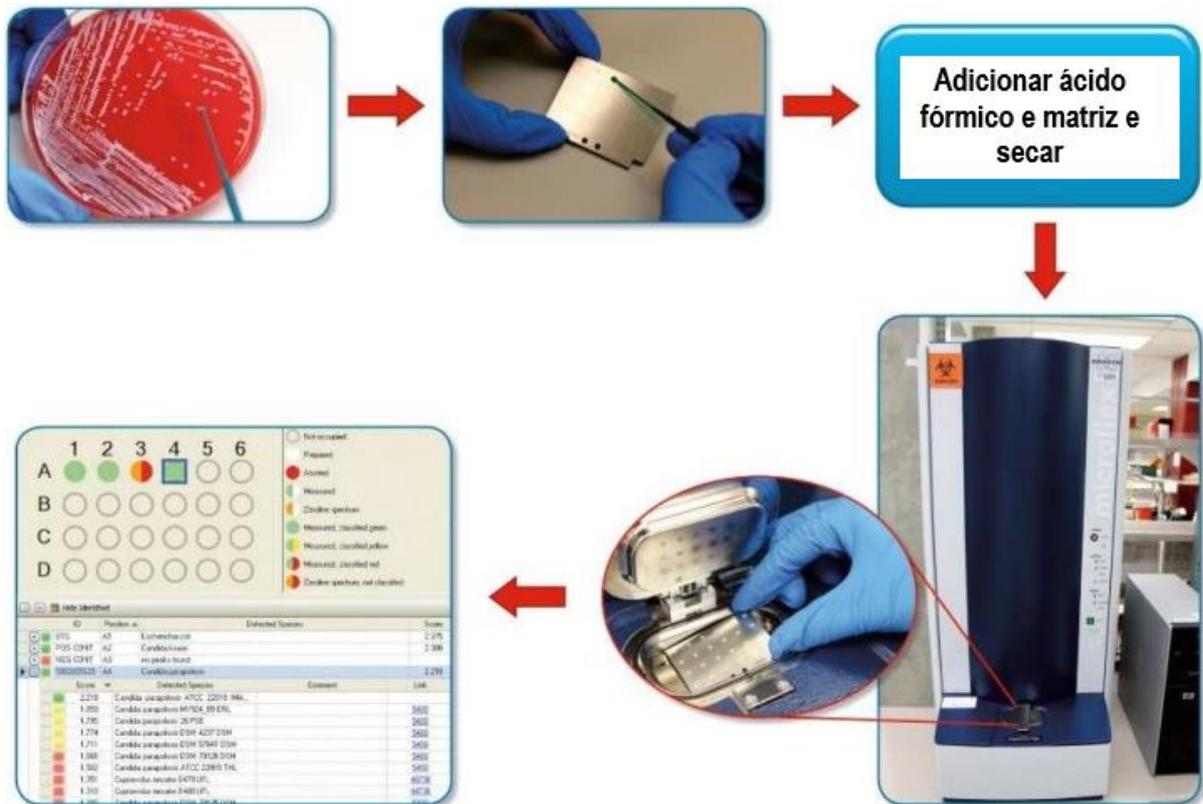
Um grande progresso no diagnóstico para a AI vem sendo estudado atualmente que é o sistema MALDI-TOF MS, da empresa multinacional de biotecnologia BioMérieux, o VITEK® MS. Em 2013, o método foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) do Estados Unidos para comercialização, e sendo o primeiro sistema de espectrometria de massa para identificação automatizada de bactérias e fungos patogênicos (COSTA, 2015).

O método de Espectrometria de Massa por Tempo de Voo - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (inglês: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS), tem como princípio geral uma rápida foto-volatilização e ionização de uma amostra biológica embebida em um ácido orgânico (matriz) após bombardeamento por um laser de radiação ultravioleta (UV), seguido pela análise da relação massa/carga (m/z) do espectro de massa (MS) gerado da amostra ionizada após o seu percurso em um tubo de voo. O MALDI-TOF MS analisa o conteúdo proteico de células tratadas ou intactas de microrganismos sob a forma de um espectro que é considerado como uma impressão digital específica de um microrganismo (MORAIS, 2018).

O processo MALDI-TOF MS para identificação de leveduras ocorre da seguinte maneira: uma colônia é retirada de uma placa de cultura para um ponto em uma placa alvo MALDI-TOF MS. Para aplicações de levedura, as células são tipicamente tratadas com ácido fórmico na placa alvo, seguido de secagem. A

mancha é recoberta com 1–2 μL de matriz e seca. A placa é colocada na câmara de ionização do espectrômetro de massa (Figura 2) Um espectro de massa é produzido e comparado com uma biblioteca de espectros de massa pelo software, resultando na identificação da levedura (Figura 5).

Figura 5. Método MALDI-TOF MS



Fonte: Adaptado de Patel (2019).

MALDI-TOF MS é um método que tem demonstrado eficácia na rápida, precisa e barata identificação de microrganismos. Atualmente existem estudos para verificar os resultados dessa tecnologia em testes de suscetibilidade antimicrobiana que também sejam rápidos, simples e baratos (GITMAN *et al.*, 2017).

3 METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma revisão bibliográfica do tipo narrativa, visando identificar dados publicados sobre o diagnóstico não baseado em cultura de *Aspergillus*, de modo a gerar um maior esclarecimento a respeito de diferentes métodos que podem ser aplicados para essa finalidade.

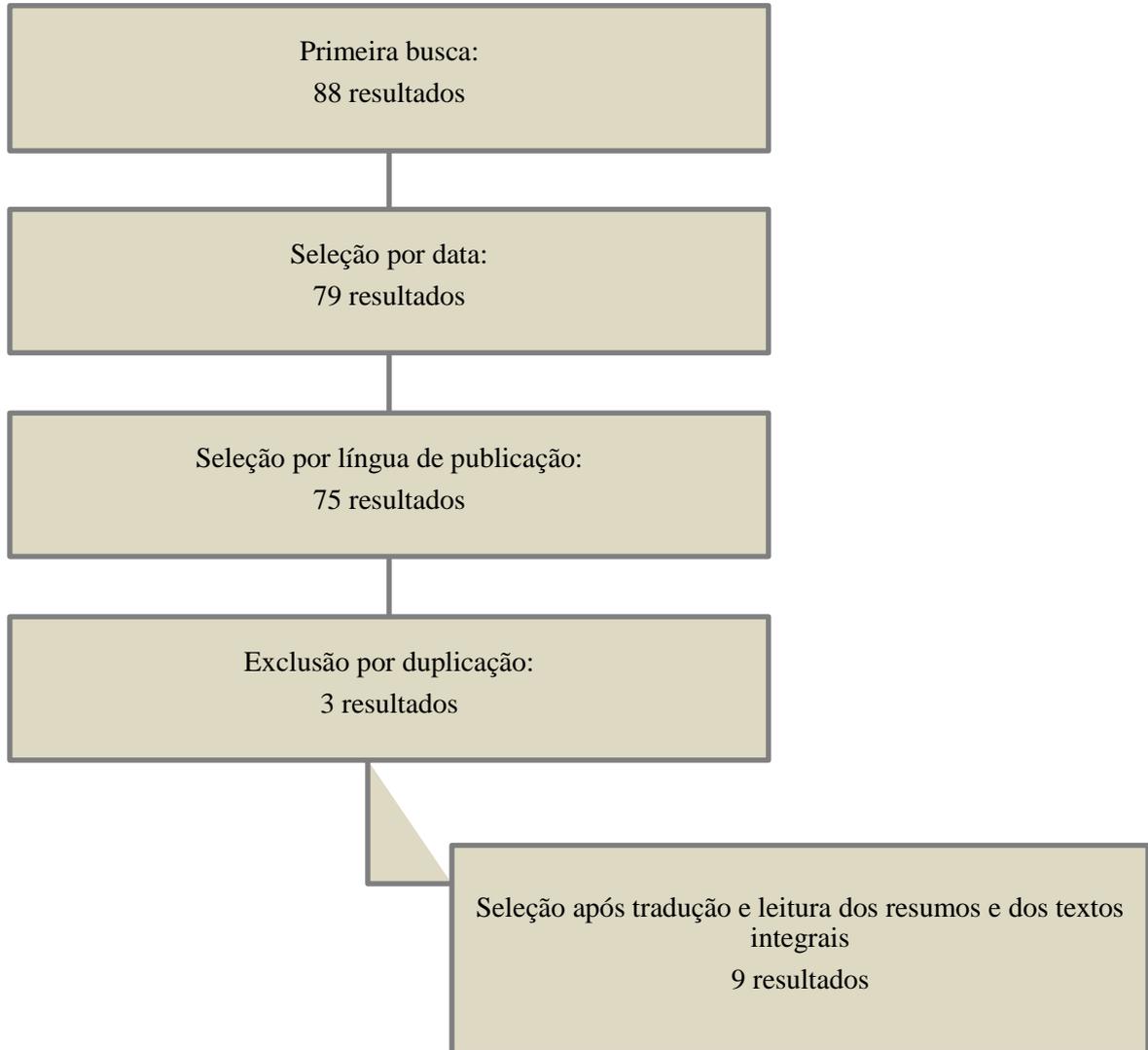
Para a revisão bibliográfica dos artigos relacionados ao diagnóstico laboratorial não cultural, foi realizada pesquisa bibliográfica nas bases de dados Scielo Brasil e PubMed, Google Acadêmico, assim como publicações em livros, dissertações e teses. O intervalo da pesquisa compreendeu o período entre 2011 e 2021. Foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: Diagnóstico laboratorial (laboratory diagnosis); Glucana (glucan); Galactomanana; Maldi-TOF; Análise genômica (genomic analysis); PCR. Esses termos foram associados a palavra *Aspergillus*, *Aspergillus fumigatus*, aspergilose, *aspergillosis*, aspergilose invasiva. Foram aplicados os operadores booleanos foram “AND” e “OR”, para que tanto artigos contendo uma das abordagens quanto ambas pudessem ser levantados e avaliados. Artigos repetidos foram considerados apenas em uma das bases.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DE PUBLICAÇÕES

Foram selecionados apenas os artigos que estejam relacionados aos objetivos específicos propostos neste projeto, como diagnóstico laboratorial de aspergiloses baseado em detecção de componentes fúngicos ou sua análise genômica. Foram excluídos artigos que envolvam diagnóstico cultural de infecções por *Aspergillus*, assim como publicações realizadas fora do período de tempo da pesquisa bibliográfica. Somente artigos publicados em português ou inglês foram considerados elegíveis, pela facilidade de tradução da língua inglesa com ferramentas confiáveis e sem grandes perdas no sentido dos resultados apresentados pelos autores dos estudos. Na sequência procedeu-se de tradução dos resumos, quando necessário, para realizar uma primeira seleção dos materiais a serem utilizados. Os artigos selecionados foram impressos, traduzidos em sua integralidade e novamente avaliados para verificar se, de fato, contribuem para o esclarecimento do tema. Após esses procedimentos foi possível selecionar os materiais que, de fato, foram utilizados para o desenvolvimento deste estudo.

A seleção de estudos é resumizada na Figura 6.

Figura 6. Seleção dos estudos



Fonte: Da autora (2021).

Como resultado aplicação da metodologia descrita anteriormente, foram selecionados os artigos conforme os critérios de inclusão destacados, chegando a um portfólio bibliográfico composto por nove estudos para o desenvolvimento da etapa de resultados e discussão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dificuldades em fazer um diagnóstico de AI fomentaram muitos estudos e testes visando encontrar abordagens efetivas, que levassem a um diagnóstico rápido e preciso com foco em melhorar os prognósticos dos pacientes, já que na maioria das vezes são imunocomprometidos e, assim, os riscos de óbito são extremamente elevados. Apesar dos esforços e dos avanços da medicina, a identificação de estratégias de diagnóstico que detectem ou prevejam AI de forma confiável segue desafiadora. Esse diagnóstico é importante para direcionar a terapia e melhorar os resultados para os pacientes, profissionais e sistemas de saúde (BARTON, 2013).

Os testes não baseados em cultura vêm se tornando mais estudados e avaliados em função de apresentarem especificidade e sensibilidade em parâmetros elevados e que, assim, asseguram um diagnóstico mais rápido, muitas vezes precoce e antes do avanço da condição, conduzindo ao tratamento preciso e prognóstico mais positivo (BARTON, 2013).

Percebe-se, assim, que os esforços para a inclusão dos testes não baseados em cultura nos parâmetros de diagnóstico em diferentes locais do mundo ocorrem de longa data e crescem continuamente após a realização de estudos que apontam para sua efetividade na busca por diagnóstico rápido, preciso e que direcione adequadamente o tratamento.

Morrissey *et al.* (2013) procederam de um ensaio clínico controlado randomizado, com 240 pacientes adultos (122 foram atribuídos a estratégia de diagnóstico padrão e 118 a estratégia de diagnóstico baseada em biomarcadores), todos submetidos ao transplante alogênico de células-tronco ou quimioterapia para leucemia aguda, sem histórico de doença fúngica invasiva. Os pacientes foram designados aleatoriamente para diagnóstico padrão (com base em cultura e histologia) ou uma estratégia de diagnóstico baseada em biomarcador (GM e PCR). Os pacientes foram acompanhados por 26 semanas ou até o óbito. Para a estratégia de diagnóstico baseada em biomarcadores, um único resultado de GM ou PCR positivo foi considerado insuficiente para confirmar AI e o tratamento foi classificado como empírico. No grupo de diagnóstico padrão 39 pacientes (32%) receberam tratamento empírico, enquanto no grupo de teste foram 18 (15%). Os resultados apontaram que o uso de GM e PCR para direcionar o tratamento reduziu o uso de

tratamento antifúngico empírico. Essa abordagem é uma estratégia eficaz para o manejo da aspergilose invasiva em pacientes hematológicos de alto risco.

Percebe-se, assim, uma redução nos riscos de óbito em função do diagnóstico preciso e facilitado, atuando como importante benefício para os pacientes. Além disso, o direcionamento do tratamento torna-se mais efetivo quando da adoção desses métodos não baseados em cultura (MORRISSEY *et al.*, 2013).

O diagnóstico de AI por meio de ensaio de β -d-glucano é bastante útil, em alguns casos associado com cultura, porém, sem essa associação existem bons resultados. A sensibilidade do teste de β -d-glucana difere entre estudos, em função da metodologia de análise e especificidades dos pacientes, porém, dados apontam que variaram de 55% a 95%, Já a especificidade desses testes é de 77% a 96% em caso de pacientes com neoplasias hematológicas com AI (ARVANITIS *et al.*, 2014).

A especificidade do teste é menor entre certas populações de pacientes, como aqueles submetidos à diálise e indivíduos com infecções bacterianas Gram-negativas simultâneas. Embora diferentes ensaios de β -glucana tenham variados valores de corte ideais para o resultado positivo, dados sugerem que o uso de um corte de 80 pg/ml está associado a melhor precisão, um resultado de 60 a 80 pg / ml é considerado indeterminado (ARVANITIS *et al.*, 2014).

O ensaio da galactomanana é bastante específico e sensível para o diagnóstico de aspergilose invasiva, porém, a galactomanana também pode ser encontrada nas paredes celulares de *Histoplasma capsulatum* e *Fusarium* spp. Pode usar amostras de soro, LBA, LCR ou líquido pleural, com especificidade e sensibilidade variável de 40 a 100% de acordo com a população testada. Tratamento de antibioticoterapia prévio reduz a especificidade e uso de antifúngico diminui sua sensibilidade (ARVANITIS *et al.*, 2014).

Esses dados apontam que a opção pelo teste de GM pode ser uma estratégia bem sucedida em termos de sensibilidade e especificidade, porém, essa opção somente deverá ser adotada após a análise do perfil do paciente, já que a presença de algumas condições pode reduzir a eficácia e confiabilidade dos resultados.

O teste de GM pode ser visto como ideal para o diagnóstico de AI por apresentar resultados melhores do que BDG, que apresenta baixa especificidade (quando comparados) em decorrência de sua natureza pan-fúngica. Todavia, existem dificuldades relacionadas ao desempenho da GM como ferramenta de

avaliação e critério diagnóstico. A principal limitação da GM sérica é a alta taxa de resultados falso-positivos por serem irreproduzíveis ou por apresentarem detecção não relacionada a AI. São irreproduzíveis os resultados não confirmados quando retestados e devem ser considerados negativos. Atualmente não existem meios de descartar com segurança um resultado positivo para GM que não esteja relacionado à AI em andamento (ALANIO; BRETAGNE, 2017).

É preciso destacar, ainda, que o desempenho da GM tem sido menos efetivo em decorrência do amplo uso de profilaxia antifúngica, assim, a estratégia de rastreamento pode se tornar ineficaz e não seria mais recomendada. A comparação entre dispositivo de fluxo lateral (LFD) (detecção de uma proteína extracelular através de anticorpo monoclonal), PCR e GM evidenciou que o melhor desempenho ocorre em combinação com PCR, chegando a 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Oferece um resultado rápido, mesmo que a PCR possa ser realizada posteriormente como um teste confirmatório (ALANIO; BRETAGNE, 2017).

Pode-se dizer, assim, que LFD é uma estratégia cada vez mais reconhecida por sua efetividade diagnóstica e que em associação com PCR pode eliminar quaisquer dúvidas decorrentes de outras análises, garantindo um diagnóstico preciso.

Um estudo de 2017 avaliou o método baseado em espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção a laser assistido por matriz (MALDI-TOF MS) para a diferenciação entre isolados de tipo selvagem e não selvagem de 20 *Aspergillus* spp. (dois isolados de *Aspergillus ustus* e um de *Aspergillus calidoustus*, usados como controle). Os resultados indicaram que, com 30 h e 48 h de incubação, foi alcançada concordância completa entre a análise da sequência Cyp51A, microdiluição e classificação MALDI-TOF MS dos isolados como tipo selvagem ou não selvagem. Os dados apontam que MALDI-TOF MS pode ser usado para detectar com precisão cepas de *A. fumigatus*, porém, com sensibilidade reduzida ao voriconazol. Nesse sentido, ao invés de provar que se trata de um método rápido e simples para o teste de suscetibilidade antifúngica, o estudo não mostrou nenhum benefício sobre os métodos de teste convencionais (GITMAN *et al.*, 2017).

A análise desses dados demonstra que mais estudos são necessários para verificar se a metodologia MALDI-TOF MS realmente é um método efetivo, rápido e barato ou se não apresenta vantagens sobre outros métodos já conhecidos e

difundidos na prática clínica. A análise da literatura aponta para heterogeneidade nos resultados, alguns positivos outros negativos e, assim, é essencial compreender quais são os motivos para essa diferença (metodologia, população, experiência com o equipamento, etc.) (GITMAN *et al.*, 2017).

O diagnóstico da AI é difícil e ocorre, na maioria dos casos, a partir de achados clínicos e radiológicos, associados a uma evidência de *Aspergillus* em amostras respiratórias ou mediante um resultado positivo para o anticorpo anti-*Aspergillus* no soro. Recentemente vêm crescendo as recomendações para a aplicação de PCR em LAB para o diagnóstico, tanto para casos de aspergilose invasiva quanto não invasiva (IMBERT *et al.*, 2018).

Um estudo conduziu uma análise retrospectiva de 4 anos em um centro de saúde de Paris, no qual os pacientes foram submetidos a PCR de LBA. Todos os pacientes suspeitos de AI ou da forma não invasiva foram avaliados. Foram obtidos resultados culturais, de GM e PCR, além de coleta de dados clínicos e radiológicos. No estudo, 641 pacientes foram submetidos a PCR para *A. fumigatus*, mas somente 613 tinham disponibilidade de todos os dados clínicos. Na amostra, 35 pacientes tinham aspergilose invasiva comprovada ou provável, 12 eram mulheres e 23 eram homens, com idade média de 59 anos. No grupo, 16 pacientes (45,7%) receberam corticoterapia e dez (28,6%) eram neutropênicos no diagnóstico (IMBERT *et al.*, 2018).

Dentre os 35 pacientes avaliados, 31 tiveram PCR positiva, mas em 32 pacientes foram realizados os três métodos (cultura, GM e PCR). Sensibilidade para PCR, GM e exame micológico foi 88,6%, 56,3% e 63,6% respectivamente. Isso demonstra que a PCR teve sensibilidade significativamente melhor do que GM ou exame micológico. De fato, GM no soro foi positiva em 19 dos 31 pacientes com AI (sensibilidade de 61%) (IMBERT *et al.*, 2018).

Esse estudo esclarece que a PCR tem a maior sensibilidade quando comparada com GM e exame micológico. O método tem se popularizado e cada vez mais laboratórios são capazes de proceder do teste de forma adequada aos padrões de qualidade e confiabilidade. Assim, surge uma opção relevante no processo de diagnóstico e busca pelo tratamento desses pacientes.

Lehrnbecher *et al.* (2018) compararam diferentes métodos e ressaltam que BG, quando comparado com GM, atua como biomarcador relevante na detecção de vários tipos de fungos patogênicos, incluindo *Aspergillus* spp, *Candida* spp, entre

outros. Porém, justamente em face disso, seus valores podem estar elevados quando da ocorrência de infecções bacterianas decorrentes de *Streptococcus pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Mesmo em indivíduos saudáveis pode ocorrer a detecção de BG. Assim, esse teste pode ser importante para descartar outras condições, mas não se trata da melhor opção para diagnóstico de AI.

A opção por PCR é sempre viável e confiável, porém, muitas associações médicas de diferentes países ainda não incluíram essa ferramenta em suas diretrizes diagnósticas. Isso ocorre por questões metodológicas, como a necessidade de definição da amostragem clínica ideal, melhor método de extração de DNA e o desenho ideal do primer (LEHRNBECHER *et al.*, 2018).

Verifica-se, assim, que apesar da grande valia dos testes de PCR, seu reconhecimento na comunidade acadêmica ainda precisa ser realizado e, para isso, mais estudos definindo os padrões metodológicos a serem adotados ainda precisam ser conduzidos e reproduzidos em diferentes amostras (LEHRNBECHER *et al.*, 2018).

Diagnósticos baseados em métodos não culturais foram desenvolvidos para *Aspergillus* e *Candida*, juntamente com outros patógenos fúngicos, porém, há um foco maior em *Aspergillus* por ser comum em hospedeiros imunocomprometidos. Esses testes incluem galactomanana, que pode ser usado no soro, fluido de lavagem broncoalveolar e outras amostras; beta- d- glucana, um ensaio não específico para *Aspergillus*, *Candida* e outras micoses; PCR, entre outros. PCR de *Aspergillus* já foi validado e atualmente figura de diretrizes internacionais. O teste de galactomanana em LBA é relevante para o diagnóstico da infecção e apresenta maior sensibilidade do que a citologia, cultura, biópsia transbrônquica ou teste de galactomanana sérica. A detecção de GM aumentou a sensibilidade do soro de 47% para 85% no LBA, mas deve-se considerar o fato de que pacientes transplantados com órgãos sólidos podem apresentar falsos positivos. A efetividade de GM é maior quando combinada com PCR. Um consenso sobre o valor de corte para uma GM de LBA positivo ainda não foi totalmente definido (PATTERSON; DONNELLY, 2019).

O teste com β - d- glucana detecta uma série de importantes gêneros de fungos, incluindo *Aspergillus*, *Candida*, *Trichosporon*, *Fusarium* e *Exserohilum*. Além disso, a avaliação de β - d- glucana comparado com PCR e hemocultura aponta que

PCR e β -d- glucana são mais sensíveis do que hemoculturas (PATTERSON; DONELLY, 2019).

Verifica-se que a aplicação de testes de β -d- glucana tem elevada sensibilidade, assemelhando-se à PCR e superior à realização de testes por hemocultura.

Maertens e Miceli (2015) ressaltam que o diagnóstico de AI raramente é obtido antes da morte dos pacientes. Os métodos convencionais de diagnóstico laboratorial, como cultura e microscopia, são bastante úteis quando positivos, porém apresentam baixa sensibilidade e demora dos resultados e, assim, diagnóstico e tratamento ocorrem de forma tardia, o que eleva ainda mais as taxas de mortalidade. Ensaio não baseado em cultura, que sejam sensíveis e rápidos na detecção de antígenos de *Aspergillus* (GM e 1,3 β -D glucano) ou detecção de sequências de DNA genômico (PCR) podem alterar a abordagem de tratamento, especialmente quando associados a achados radiológicos sugestivos da condição.

Percebe-se, assim, que os testes não baseados em cultura conferem maior agilidade, sensibilidade e especificidade e, assim, direcionam o tratamento de forma mais efetiva e elevam as chances de recuperação dos pacientes.

CONCLUSÃO

As doenças fúngicas invasivas geram elevado risco de mortalidade, porém, isso pode ser reduzido com tratamento precoce. Diagnosticar doenças fúngicas invasivas, apesar de todos os avanços no diagnóstico, ainda é um desafio, pois os métodos invasivos para obtenção de amostras histológicas frequentemente não são viáveis em alguns grupos de pacientes. As culturas fúngicas, por sua vez, apresentam baixa sensibilidade e necessitam de um longo tempo para gerar a resposta. Os métodos não baseados em cultura são fundamentais para um diagnóstico rápido de doenças fúngicas invasivas e incluem ensaios baseados na detecção de antígenos fúngicos (GM, dispositivo de fluxo lateral, PCR, entre outros). Esses testes são geralmente aplicados ao diagnóstico de AI e outras condições, alguns com desempenho único efetivo, outros com excelentes resultados quando combinados entre si.

A avaliação dos artigos selecionados para a etapa de resultados e discussão demonstrou que os métodos não culturais vêm sendo avaliados de forma mais comum ao longo dos anos, com um posicionamento dos autores de que apresentam especificidade e sensibilidade elevadas, muitos deles com custos baixos e facilidade de acesso em laboratórios diversos. Com isso, as análises baseadas em culturas já não são consideradas as técnicas mais acessíveis, fáceis de aplicação e compreensão ou com melhores resultados.

Ainda existem diretrizes que definem os métodos baseados em cultura como os mais comuns e padronizados para o diagnóstico de AI, porém, essas diretrizes vêm sendo revistas e atualizadas como forma de inserir os testes não baseados em cultura pela ampla gama de opções que isoladas ou associadas, de acordo com a disponibilidade em cada local e conhecimentos técnicos sobre elas, podem levar a um diagnóstico mais preciso e com a possibilidade de direcionar o tratamento de forma mais efetiva, reduzindo os índices de morbidades e mortalidade entre pacientes que apresentam comprometimentos do sistema imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANIO, Alexandre; BRETAGNE, Stéphane. Challenges in microbiological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections. *F1000Research*. 2017; vol. 6 F1000 Faculty Rev-157. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5321116/>. Acesso em: 2 set. 2021.
- AMORIM, Daniela Silva de et al. Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. **PULMÃO RJ**, v. 13, n. 2, p. 2, 2004.
- ARVANITIS, Marios et al. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. **Clinical microbiology reviews**. 2014; vol. 27, n. 3, p. 490-526. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4135902/>. Acesso em: 30 ago. 2021.
- BANDRES, Maria V., MODI, Pranav; SHARMA, Sandeep. *Aspergillus Fumigatus*. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482464/>. Acesso em: 16 ago. 2021.
- BARBOSA, R.P., SILVA, R., RODRIGUES, A.G., RAMALHO, V. Aspergilose pulmonar invasiva causada por *Aspergillus fumigatus*. *Revista Saúde em Foco*, 11: 463-467, 2019.
- BARTON, Richard C. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. **Scientifica**. 2013; vol. 2013: 459405. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820361/>. Acesso em: 1 set. 2021.
- BRANDÃO, Ildnay de Souza Lima. **Análise comparativa entre métodos laboratoriais para diagnóstico da aspergilose pulmonar**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BERNARDI, Rafaela Manzoni. Avaliação da acurácia diagnóstica da galactomanana no lavado broncoalveolar de pacientes com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas. 2019.
- CARVALHO, L.I.C. **Aspergillus e Aspergilose—Desafios no Combate da Doença**. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. Porto. Portugal. 56 p. 2013.
- COSTA, Ane Francyne et al. **Novas abordagens no diagnóstico laboratorial de micoses: o sistema MALDI-TOF MS**. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.
- GAVRONSKI, Suellen; BOTELHO, T. K. R.; CORDOVA, C. M. M. Diagnóstico laboratorial de aspergilose invasiva: avaliação de métodos moleculares e detecção de antígenos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, p. 96-109, 2016.

GITMAN, Melissa R. et al. Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp. by Using a Composite Correlation Index (CCI)-Based Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method Appears To Not Offer Benefit over Traditional Broth Microdilution Testing. **Journal of clinical microbiology**. 2017; vol. 55, n. 7, p. 2030-2034. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483904/>. Acesso em: 2 set. 2021.

GOMES, Cinthya Cristina et al. *Aspergillus* in endodontic infection near the maxillary sinus. **Braz J Otorhinolaryngol**. 2015;81:527-32. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.07.013>. Acesso em: 1 set. 2021.

IMBERT, Sébastien et al. *Aspergillus* PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis and Prognosis of Aspergillosis in Patients With Hematological and Non-hematological Conditions. **Frontiers in microbiology**, 2018; vol. 9 1877. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102318/>. Acesso em: 6 ago. 2021.

JENKS, Jeffrey D, and Martin Hoenigl. Treatment of Aspergillosis. **Journal of fungi** (Basel, Switzerland), 2018; vol. 4,3 98. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6162797/>. Acesso em: 19 ago. 2021.

LATGÉ, Jean-Paul; CHAMILOS, Georgios. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical microbiology reviews**. 2019; vol. 33,1 e00140-18. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6860006/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

LEHRNBECHER, Thomas et al. Diagnostic Approaches for Invasive Aspergillosis-Specific Considerations in the Pediatric Population. **Frontiers in microbiology**. 2018; vol. 9, 518. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879093/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

MAERTENS, Joan; MICELI, Marisa. Role of Non-Culture-Based Tests, with an Emphasis on Galactomannan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. 2015; 36(05), 650–661.

MARR, Kieren A. et al. Aspergillosis Complicating Severe Coronavirus

Disease. **Emerging infectious disease**. vol. 27,1 (2021): 18–25. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7774554/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

MESQUITA-ROCHA, S. Teste de galactomanana para o diagnóstico de aspergilose invasiva: uma revisão. *R. Inst. Adolfo Lutz* ; 77: e1749, 2018.

MORRISSEY, C. Orla et al. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**. 2013; 13(6), 519–528.

MOUSAVI, B et al. *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. **Current medical mycology**, vol. 2,1 (2016): 36-42. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5490296/>. Acesso em: 16 ago. 2021.

MYCOLOGY ONLINE. *Aspergillus*. Disponível em: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/aspergillus/>. Acesso em: 1 set. 2021.

OLIVEIRA, Jeferson Carvalhaes de. **Tópicos em Micologia Médica**. Rio de Janeiro; 2014. 230 p; ISBN 85-900986-1-3.

SÁ, Mariana Morais et al. **Aspergilose invasiva: diagnóstico clínico, laboratorial e terapêutica preconizada**. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Farmácia. Universidade Federal da Paraíba. 2018.

PASTERNAK, Jacyr. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein**, v. 10, p. 118-119, 2012.

PATTERSON, Thomas F et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, vol. 63,4 (2016): e1-e60. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4967602/>. Acesso em: 17 ago.2021.

PATEL, Robin. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**. 2019; vol. 5, N. 1, 4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463175/>. Acesso em: 4 set. 2021.

PATTERSON, Thomas F.; DONELLY, J Peter. New Concepts in Diagnostics for Invasive Mycoses: Non-Culture-Based Methodologies. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**. 2019; vol. 5, n. 1, 9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463019/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

PAULUSSEN, Caroline et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial biotechnology**, vol. 10,2 (2017): 296-322. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328810/>. Acesso em: 16 ago. 2021.

PILANIYA, Vikas et al. Aspergilose pulmonar invasiva aguda, logo após exposição ocupacional a água poluída barrenta, em indivíduo previamente saudável. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 473-477, 2015.

SALES, Maria da Penha Uchoa. Capítulo 5-Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1238-1244, 2009.

SILVA, Rodney Frare. Capítulo 8-Infecções fúngicas em imunocomprometidos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010.

TAKAZONO, Takahiro; IZUMIKAWA, Koichi. Recent Advances in Diagnosing Chronic Pulmonary Aspergillosis. **Frontiers in microbiology**, 2018; vol. 9 1810. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6107790/>. Acesso em: 19 ago. 2021.

VUONG, Michaelia Fosses; WAYMACK, James R. Aspergillosis. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482241/>. Acesso em: 14 ago.2021.

XAVIER, Melissa Orzechowski; OLIVEIRA, Flávio de Mattos; SEVERO, Luiz Carlos. Capítulo 1: diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 907-919, 2009.