



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Detecção de *Aspergillus fumigatus* em Hemoculturas

Carla Maria de Gouveia Rosa

2008

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas, sob a orientação da Professora Doutora Cidália Pina-Vaz e co-orientação da Professora Doutora Maria Isaura Pinto de Sousa. Trabalho desenvolvido no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

*Aos meus Pais,
por serem a minha vida*

Agradecimentos

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Estou especialmente agradecida à Professora Doutora Cidália Pina-Vaz do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto por me ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação pessoal e científica, pelas pertinentes sugestões e críticas, toda a inestimável confiança e incentivo. Numa tese sobre ciência, senso comum e dificuldades, a sua orientação deu testemunho de como qualidade e formação científicas podem coexistir com humanismo, afabilidade e compreensão.

Ao Professor Doutor Acácio Gonçalves Rodrigues, Director do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, o meu agradecimento sincero pelo espírito crítico, comentários, ensinamentos transmitidos e tempo generosamente despendido.

Agradeço à Professora Doutora Maria Isaura Pinto de Sousa do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pelos sábios conselhos e recomendações na co-orientação deste trabalho.

Aos restantes elementos do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto que têm um lugar especial no meu coração:

- Ao Ricardo Araújo agradeço e manifesto o meu profundo reconhecimento pela amizade, pelas longas horas de paciência, dedicação e esforço na superação das mais diversas dúvidas, incertezas e desafios com que me fui confrontando e pelo empenho com que me acompanhou sistematicamente ao longo deste trabalho, sem o qual a concretização desta tese não teria sido possível.

- À Maria José Gilli e à Joana Barbosa, a minha sincera gratidão pela amizade incondicional, estima, compreensão, toda a força, estímulo e convicção. Mesmo quando eu duvidei, elas acreditaram sempre.

- À Ana Silva, Sofia Costa-de-Oliveira, Ana Isabel Dias, Elisabete Ricardo, Isabel Miranda e Isabel Santos um agradecimento especial pela amizade e carinho com que me receberam, a disponibilidade e apoio que sempre demonstraram no desenvolvimento deste trabalho e as palavras de incentivo.

Agradeço ainda à Quilaban por toda a informação e pela disponibilização dos frascos de cultura BACTEC™ sem os quais este trabalho não teria sido possível.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento”.

Pv 3:13

Resumo

A aspergilose invasiva, causada principalmente por *Aspergillus fumigatus*, representa um grave problema clínico particularmente em doentes imunocomprometidos, por estar invariavelmente associada a taxas de morbidade e de mortalidade extremamente elevadas. A sua incidência tem aumentado nas últimas décadas pelo facto da população alvo estar em franca expansão, mas também pela incapacidade de se estabelecer um diagnóstico definitivo em tempo útil, em que a instituição de uma terapêutica adequada poderia melhorar significativamente o prognóstico desses doentes. Apesar de se tratar de uma infecção invasiva, frequentemente com disseminação sistémica, e dos avanços recentes dos sistemas automatizados em termos de sensibilidade e rapidez de detecção de agentes microbianos responsáveis por bacteremia ou fungemia, as hemoculturas são normalmente negativas para *Aspergillus*, o que não se verifica em micoses invasivas associadas a outros agentes, como Zygomycetes.

Compararam-se três frascos de cultura BACTEC™ distintos em termos de tempo de detecção de *A. fumigatus* nos sistemas automatizados BACTEC™ 9240 e 9000 MB e sua posterior recuperação em meio sólido. Para a repicagem, avaliaram-se duas técnicas: o método de rotina, utilizando uma agulha e a recolha de 1-2 gotas da suspensão contida no frasco de cultura, e um novo método, em que após agitação vigorosa dos frascos de cultura é retirada uma alíquota maior (100 µL) com uma seringa de insulina. Em simultâneo, avaliou-se a hipotética interferência da presença concomitante de outros microrganismos, tais como bactérias Gram positivo e Gram negativo e leveduras, e de antifúngicos na detecção e recuperação de *A. fumigatus*. Para concentrações superiores a 0,3 conídios/mL,

A. fumigatus foi detectado em 21-40 h nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F e significativamente mais tarde, em 39-100 h, nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic. Os menores tempos de detecção foram obtidos com valores superiores de inóculo. Todavia, a subsequente repicagem para meios de cultura sólidos originou várias subculturas negativas, o que pode levar a interpretação errónea de resultados falso-positivos dos equipamentos BACTEC™. O novo método de repicagem proposto permitiu ultrapassar essa limitação. Os frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F demonstraram vantagem na detecção de *A. fumigatus* na presença concomitante de bactérias, e os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F na presença de antifúngicos.

Os sistemas automatizados BACTEC™ garantem uma detecção rápida e sensível de *A. fumigatus* presente no sangue. Os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F parecem ser os mais recomendáveis, particularmente em doentes já submetidos a tratamento antifúngico. Perante a suspeita de infecção polimicrobiana, a inoculação adicional de um frasco de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F apresenta vantagens.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; hemoculturas; BACTEC™; aspergilose invasiva; fungemia.

Abstract

Invasive aspergillosis, mainly due to *Aspergillus fumigatus*, represents a critical clinical problem particularly among immunocompromised patients, with inherent high morbidity and mortality rates. Over the last decades, its incidence has increased faintly due to the increasing number of patients with risk factors and to the inability to establish an accurate early diagnosis, which delays the initiation of a targeted therapeutic strategy crucial to improve the clinical outcome. Although being an invasive infection with systemic spread and in spite of the availability of improved automated systems providing a sensitive and fast detection of microbial agents usually responsible for bloodstream infections, blood cultures invariably yield a negative result for *Aspergillus*, unlike to other agents of invasive mycosis, as Zygomycetes.

The detection time and recovery of *A. fumigatus* were compared in three distinct BACTEC™ culture vials, incubated in the BACTEC™ 9240 and 9000 MB automated systems. Two approaches were tested for subculture in solid medium: the routine method, using a sterile airway needle/subculture unit for collection of 1-2 drops of the suspension of culture vial, and a new procedure, using tuberculin disposable syringes for collection of a larger aliquot (100 µL), after vigorous agitation of the culture vials. Additionally, the hypothetical interference of the concomitant presence of other microorganisms, such as gram positive and gram negative bacteria and yeasts, and of antifungal agents on detection time and recovery of *A. fumigatus* was evaluated. *A. fumigatus* was detected at inoculum concentrations higher than 0.3 conidia/mL following 21-40 hours, both in BACTEC™ Plus Aerobic/F and BACTEC™ Mycosis-IC/F vials; BACTEC™ Myco/F Lytic vials

provided *A. fumigatus* detection significantly later (39-100 hours). Shorter detection times were obtained with higher inocula. The following subcultures on solid media resulted in several false negative results when using the routine sampling method; the new procedure overcame this limitation. BACTEC™ Mycosis-IC/F vials showed advantage in the presence of concomitant bacteria and BACTEC™ Plus Aerobic/F vials in the presence of antifungal agents.

BACTEC™ automated systems allowed a sensitive and fast detection of *A. fumigatus* in blood. BACTEC™ Plus Aerobic/F vials may show advantage particularly in patients under antifungal treatment. In cases of suspected polymicrobial bloodstream infection, the inoculation of a BACTEC™ Mycosis-IC/F in addition may be advisable.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; blood cultures; BACTEC™ automated systems; invasive aspergillosis; fungemia.

Lista de Abreviaturas e Siglas

° – Grau

°C – Grau Célsius

% – Percentagem

AI – Aspergilose Invasiva

AMB – Anfotericina B

ATCC – “American Type Culture Collection”

BG – (1→3)-β-D-glucano

CEM – Concentração Efectiva Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CO₂ – Dióxido de Carbono

CPF – Caspofungina

DFI – Doença Fúngica Invasiva

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EIA – “Enzyme Immunoassay”

EORTC/MSG – “Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer” / “Mycoses Study Group of the National Institutes of Allergy and Infectious Diseases”

FDA – “Food and Drug Administration”

GM – Galactomanano

GMS – Metanamina de Prata de Gomori
gr – Grama
h – Horas
H&E – Hematoxilina Eosina
IDSA – “Infectious Diseases Society of America”
ITC – Itraconazole
ITS – “Internal Transcribed Spacer Regions”
KOH – Hidróxido de Potássio
mL – Mililitro
O₂ – Oxigênio
PAS – Ácido Periódico de Schiff
PBS – Tampão Fosfato Salino
PCR – “Polimerase Chain Reaction”
pg – Picograma
PSC – Posaconazole
RNA – Ácido Ribonucleico
rRNA – Ácido Ribonucleico ribossômico
SPS – Polianetolsulfonato de sódio
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
µg – Micrograma
µL – Microlitro
µm – Micrómetro
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana
VRC – Voriconazole

Índice

1 Introdução	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Aspergilose invasiva: apresentação clínica, factores de risco e epidemiologia...	2
1.3 Diagnóstico de aspergilose invasiva	4
1.3.1 Exame micológico convencional	5
1.3.2 Diagnóstico indirecto	11
1.3.3 Pesquisa de antígenos	11
1.3.3.1 Detecção de galactomanano	11
1.3.3.2 Detecção de (1→3)-β-D-glucano	14
1.3.4 Diagnóstico molecular	16
1.4 Tratamento e susceptibilidade aos antifúngicos	17
2 Objectivos	20
3 Materiais e Métodos	21
3.1 Estirpes fúngicas	21
3.2 Inoculação dos frascos de cultura BACTEC™	22
3.3 Inoculação concomitante com outros microrganismos.....	23
3.4 Inoculação concomitante com antifúngicos.....	24
3.5 Incubação nos sistemas automatizados BACTEC™	25
3.6 Repicagem dos frascos de cultura BACTEC™	26

3.7 Tratamento de dados e análise estatística	28
4 Resultados	29
4.1 Detecção de <i>A. fumigatus</i> nos frascos de cultura BACTEC™	29
4.2 Avaliação da presença concomitante de outros microrganismos	31
4.3 Avaliação da presença concomitante de antifúngicos	33
4.4 Subculturas dos frascos de cultura BACTEC™	35
5 Discussão	38
5.1 Detecção de <i>A. fumigatus</i> nos frascos de cultura BACTEC™	38
5.2 Subculturas dos frascos de cultura BACTEC™	41
6 Conclusão	43
7 Perspectivas Futuras	45
Referências Bibliográficas	46

Índice de Figuras

Figura 1. Conidióforos e conídios de <i>A. fumigatus</i> (KOH; x400) (retirado de Mennink-Kersten <i>et al.</i> , 2004)	6
Figura 2. <i>A. fumigatus</i> numa amostra de biópsia pulmonar (H&E; x100) (retirado de Tarrand <i>et al.</i> , 2003)	7
Figura 3. Colónias de <i>A. fumigatus</i> com 7 dias de cultura em Sabouraud dextrose agar em rampa (retirado de Mennink-Kersten <i>et al.</i> , 2004)	8
Figura 4. Frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F, BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Myco/F Lytic (da esquerda para a direita).....	23
Figura 5. Incubação dos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F no equipamento BACTEC™ 9240	26
Figura 6. Método de rotina de repicagem para a recuperação de <i>A. fumigatus</i> a partir dos frascos de cultura BACTEC™	27
Figura 7. Novo método de repicagem para a recuperação de <i>A. fumigatus</i> a partir dos frascos de cultura BACTEC™, utilizando-se uma seringa de insulina e uma alíquota de	

100 µL da suspensão contida no frasco de cultura, recolhida após vigorosa agitação do mesmo..... 27

Figura 8. Crescimento macroscópico de *A. fumigatus* no meio líquido dum frasco de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F 36

Índice de Gráficos

- Gráfico 1.** Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus*, pelos equipamentos BACTEC™ 9240 e 9000 MB **30**
- Gráfico 2.** Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e sangue humano, pelo equipamento BACTEC™ 9240..... **30**
- Gráfico 3.** Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e sangue humano, pelo equipamento BACTEC™ 9240..... **31**
- Gráfico 4.** Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e sangue humano, pelo equipamento BACTEC™ 9000 MB **31**
- Gráfico 5.** Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com outros microrganismos (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*), pelo equipamento BACTEC™ 9240 .. **32**

Gráfico 6. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com outros microrganismos (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*), pelo equipamento BACTEC™ 9000 MB **32**

Gráfico 7. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com outros microrganismos (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*), pelo equipamento BACTEC™ 9240 .. **33**

Gráfico 8. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com anfotericina B (AMB), caspofungina (CPF), posaconazole (PSC) e voriconazole (VRC), pelo equipamento BACTEC™ 9240 **34**

Gráfico 9. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com anfotericina B (AMB), caspofungina (CPF), posaconazole (PSC) e voriconazole (VRC), pelo equipamento BACTEC™ 9240 **35**

Gráfico 10. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com anfotericina B (AMB), caspofungina (CPF), posaconazole (PSC) e voriconazole (VRC), pelo equipamento BACTEC™ 9000 MB **35**

1 Introdução

1.1 Considerações gerais

O género *Aspergillus* engloba mais de uma centena de fungos filamentosos saprofitos, com distintas características morfológicas macroscópicas e microscópicas, que se encontram amplamente distribuídos na natureza. Destas, apenas cerca de uma dezena é capaz de provocar infecção no Homem e noutros animais, destacando-se o *Aspergillus fumigatus* Fresen. (1863) como a espécie mais frequentemente patogénica, sendo responsável por cerca de 90% das infecções em humanos. Outras espécies, tais como, *Aspergillus flavus* Link (1809), *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter (1884), *Aspergillus terreus* Thom (1918) e *Aspergillus niger* Tiegh. (1867), são ainda agentes de infecção relativamente frequentes. *Aspergillus glaucus* (L.) Link (1809), *Aspergillus clavatus* Desm. (1834), *Aspergillus ustus* (Bainier) Tom & Church (1926) e *Aspergillus ochraceus* G. Willh. (1877) apenas causam infecção esporadicamente (Latgé, 1999; Abarca, 2000; Klich, 2002).

Os membros do género *Aspergillus* podem ser isolados a partir de uma grande variedade de substratos, especialmente provenientes de zonas húmidas ou com matéria orgânica em decomposição (Latgé, 1999). São responsáveis pela produção de uma grande variedade de metabolitos, enzimas e ácidos, alguns dos quais explorados a nível industrial (Klich, 2002).

1.2 Aspergilose invasiva: apresentação clínica, factores de risco e epidemiologia

Os conídios de *Aspergillus* são ubíquos e dada a sua facilidade de dispersão e o seu pequeno tamanho (2,5 a 3µm de diâmetro), podem permanecer em suspensão no ar, o que facilita a sua disseminação; sobrevivem no meio ambiente durante largos períodos de tempo, aguardando as condições ideais para a germinação e desenvolvimento de micélio, contaminando qualquer superfície em contacto com o ar (Latgé, 1999). Assim, o Homem encontra-se constantemente exposto à sua inalação, podendo *Aspergillus* causar um grupo de doenças conhecido como aspergiloses (Latgé, 1999; Barnes & Marr, 2006). Estas podem ser classificadas como invasivas, crónicas (ou saprofíticas) ou alérgicas (Barnes & Marr, 2006). As doenças invasivas incluem essencialmente infecções do tracto respiratório inferior. Se o sistema imunitário do doente alvo estiver enfraquecido, os conídios inalados germinarão e serão produzidas hifas que irão invadir os tecidos circundantes, levando ao desenvolvimento da doença. Eventualmente, o sistema nervoso central, 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 & Marr, 2006). As infecções crónicas, que incluem otomicoses e aspergiloma pulmonar, caracterizam-se pelo crescimento crónico de *Aspergillus* em espaços pré-formados e mal irrigados e não são invasivas (Hope *et al.*, 2005a; Barnes & Marr, 2006). A aspergilose broncopulmonar alérgica e a sinusite alérgica por *Aspergillus* têm por base imunopatologia alérgica (Stevens *et al.*, 2003). A variedade de manifestações clínicas provocadas pelos membros do género *Aspergillus* é bastante heterogénea, estando a maioria sobretudo dependente do estado imunológico do doente, tanto a nível local como sistémico, mais do que da virulência intrínseca do fungo ou ainda da forma de exposição (Hope *et al.*, 2005a; Araujo, 2007). Deste modo, os casos clínicos de aspergilose desenvolvem-se em doentes e em situações clínicas específicas, sendo actualmente a aspergilose invasiva (AI) a forma mais frequente de manifestação (Latgé, 1999; Stevens *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2005a; Barnes & Marr, 2006; Araujo, 2007; Walsh *et al.*, 2008).

Nas últimas três décadas, a incidência de AI tem vindo a aumentar particularmente em doentes com sistema imunitário deficitário ou suprimido, muito pelo facto desta população estar em franca expansão, afectando mais raramente doentes imunocompetentes. Assim, os doentes com maior risco de desenvolver AI incluem: i) doentes neutropénicos, estando o grau (contagem absoluta de neutrófilos $<100/\mu\text{L}$) e a duração da neutropenia (>10 dias) directamente relacionados com o risco de AI; ii) receptores de transplante alogénico de medula óssea; iii) receptores de transplante de órgãos sólidos; iv) receptores de transplante autólogo de medula óssea; v) doentes hemato-oncológicos; vi) doentes com doença granulomatosa crónica; vii) doentes em estado avançado de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH); viii) doentes sujeitos a tratamentos prolongados com doses elevadas de glucocorticóides ou com outros agentes imunossupressores ou citotóxicos; e ix) doentes críticos não neutropénicos admitidos em Unidades de Cuidados Intensivos, sem os factores de risco clássicos, mas particularmente se for exacerbações de doença pulmonar obstrutiva crónica ou outra doença pulmonar crónica, diabetes mellitus, insuficiência hepática aguda ou cirrose avançada, insuficiência renal crónica ou quase-afogamento (Latgé, 1999; Holding *et al.*, 2000; Winkelstein *et al.*, 2000; Kontoyiannis & Bodey, 2002; Libanore *et al.*, 2002; Marr *et al.*, 2002; Singh & Paterson, 2005; Chamilos *et al.*, 2006; Segal & Walsh, 2006; Araujo, 2007; Meersseman *et al.*, 2007; Trof *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2008; Lewis & Kontoyiannis *et al.*, 2008).

A AI é uma importante causa de morbilidade, mas também de mortalidade, particularmente nos doentes imunocomprometidos. Em doentes hemato-oncológicos com AI, a mortalidade varia entre 30 e 50% (Maertens *et al.*, 2007b). Em doentes transplantados verificam-se taxas de mortalidade extremamente elevadas, de 74 a 92%, dependendo do tipo de transplante, com mortalidade mais elevada em transplantes de medula óssea, de fígado e, principalmente, de pâncreas. Cerca de 9,3 a 16,9% das mortes em doentes transplantados no primeiro ano são atribuídas à AI (Singh & Paterson, 2005). Assim, a taxa de sobrevivência em doentes com AI varia de $<10\%$ a mais de 60-70%, dependendo da apresentação clínica da infecção e do grau de imunodeficiência (Maertens *et al.*, 2007b).

Os factores associados à mortalidade global e atribuível à AI foram recentemente identificados num estudo de Nivoix *et al.* (2008), envolvendo 289 casos de AI provada,

provável ou possível. Neste estudo, os factores de prognóstico identificados que se correlacionam com mortalidade global foram: i) receptores de medula óssea ou de órgãos sólidos; ii) progressão de doença maligna subjacente; iii) doença respiratória prévia; iv) terapia corticóide; v) insuficiência renal; vi) baixa contagem de monócitos; vii) aspergilose disseminada; viii) lesões pulmonares difusas; ix) derrame pleural; e x) aspergilose provada ou provável. Os mesmos factores são também preditores de um aumento da mortalidade atribuível à AI com as seguintes excepções: derrame pleural e baixa contagem de monócitos, considerando-se a neutropenia associada à maior mortalidade atribuível.

1.3 Diagnóstico de aspergilose invasiva

O diagnóstico definitivo das doenças fúngicas invasivas (DFI), particularmente na sua fase inicial, permanece ainda hoje muito difícil de estabelecer, remanescendo essencialmente a suspeita em doentes com factores de risco. Os sinais e os sintomas clínicos são inespecíficos, muito variáveis, de aparecimento tardio no decurso da doença e, inclusive, muitos doentes são assintomáticos devido à imunossupressão, pelo que um elevado número de casos de DFI são diagnosticadas pós-mortem. Cerca de 75% das DFI e cerca de um terço dos casos de AI não são diagnosticados ante-mortem (Kontoyiannis & Bodey, 2002; Vaideeswar *et al.*, 2004; Chamilos *et al.*, 2006; Tuon, 2007).

Atendendo à substancial controvérsia relativa aos critérios diagnósticos de DFI, membros do “Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer” (EORTC-IFICG) e do “Mycoses Study Group of the National Institutes of Allergy and Infectious Diseases” (NIAID-MSG) estabeleceram por consenso as primeiras definições padronizadas para DFI, em doentes hemato-oncológicos e receptores de transplante de medula óssea (Ascioglu *et al.*, 2002). Actualmente, as DFI são classificadas segundo três níveis de probabilidade em DFI provada, provável ou possível, dependendo estas definições da acumulação de factores predisponentes do hospedeiro juntamente com manifestações clínicas e evidências

micológicas (De Pauw *et al.*, 2008). Casos de DFI provada requerem a presença histopatológica ou citopatológica de elementos fúngicos ou da sua observação microscópica directa em amostras obtidas por procedimentos invasivos, acompanhadas de evidência de danos nos tecidos, e uma cultura fúngica positiva a partir de localizações habitualmente amicrobianas, conjuntamente com dados clínicos ou radiológicos compatíveis com infecção (excluindo amostras de lavado bronco-alveolar, da cavidade craniana e de urina). Na DFI provável, deve cumprir-se um critério de factor do hospedeiro, uma evidência clínica e uma evidência micológica, compatíveis com infecção. A categoria de DFI possível apenas implica a presença de um factor do hospedeiro e de uma evidência clínica consistente com DFI (De Pauw *et al.*, 2008). Assim, de acordo com estas definições, o termo “aspergilose invasiva” pode então assumir um perfil diagnóstico de AI provada, provável ou possível.

1.3.1 Exame micológico convencional

O exame microscópico directo das amostras clínicas deve ser o procedimento de primeira linha sempre que se suspeite de um fungo enquanto agente etiológico, sendo provavelmente o procedimento útil na detecção da presença de elementos fúngicos, na medida em que pode fornecer um diagnóstico presuntivo rápido. Podem ser visualizadas preparações a fresco com ou sem adição de hidróxido de potássio (KOH) (Figura 1) ou ser utilizadas colorações simples como o azul de metileno, a coloração de Gram ou de Giemsa ou ainda técnicas fluorescentes, tais como o calcofluor (Hope *et al.*, 2005b; McClenny, 2005; Alexander & Pfaller, 2006). No entanto, todos estes métodos de exame directo são menos sensíveis do que o método cultural e resultados negativos não excluem uma infecção fúngica (Alexander & Pfaller, 2006).

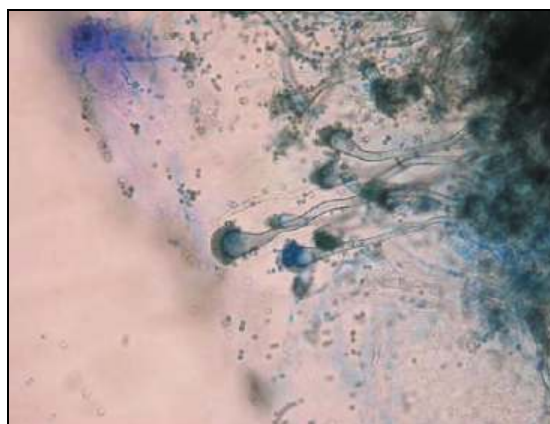


Figura 1. Conidióforos e conídios de *A. fumigatus* (KOH; x400) (retirado de Mennink-Kersten *et al.*, 2004)

Os métodos histopatológicos, com visualização de elementos fúngicos nos tecidos, continuam a ser o “gold standard”, conjuntamente com uma cultura positiva e dados clínicos ou radiológicos compatíveis com infecção, para o diagnóstico de DFI provada, segundo as definições EORTC/MSG (Ascioglu *et al.*, 2002; De Pauw *et al.*, 2008). Nosari *et al.* (2003) observaram que a obtenção de biópsias guiadas por tomografia computadorizada em doentes hemato-oncológicos é um procedimento diagnóstico muito sensível e de elevado valor predictivo, em geral desprovido de complicações, se bem que se possam obter resultados falso-negativos em caso de não se obter tecido invadido pelo micélio. No entanto, a sua principal desvantagem reside na sua incapacidade de distinção definitiva entre diferentes espécies de *Aspergillus* ou mesmo de outros fungos filamentosos patogénicos, tais como *Fusarium* spp. ou *Scedosporium* spp. Antevê-se assim mandatário o isolamento e a identificação do agente etiológico para um diagnóstico preciso (Nosari *et al.*, 2003; Tarrand *et al.*, 2003; McClenny, 2005; Alexander & Pfaller, 2006). Para melhor visualização das hifas septadas nos tecidos e sua identificação, podem ser utilizadas colorações tais como metanamina de prata de Gomori (GMS), ácido periódico de Schiff (PAS) ou hematoxilina eosina (H&E) (Figura 2) (Tarrand *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2005b; Alexander & Pfaller, 2006). Nas secções de tecido, *Aspergillus* forma hifas septadas hialinas e delgadas, que exibem ramificações dicotómicas progressivas até um ângulo de 45° (Tarrand *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2005b; McClenny, 2005). A coloração

imunohistológica também tem sido utilizada para a identificação de fungos em amostras clínicas e vários anticorpos monoclonais ou policlonais fluorescentes têm sido desenvolvidos numa tentativa de diferenciação dos géneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp. *in situ*. Todavia, o elevado grau de parentesco antigénico entre estes e outros fungos patogénicos, resulta numa significativa reactividade cruzada e consequente baixa especificidade do procedimento (Alexander & Pfaller, 2006). Acresce a dificuldade de que nem sempre os procedimentos invasivos necessários à obtenção de biópsias são possíveis, dado as co-morbilidades deste tipo de doentes (Kontoyiannis & Bodey, 2002; Nosari *et al.*, 2003; Tarrand *et al.*, 2003; Chamilos & Kontoyiannis, 2006).

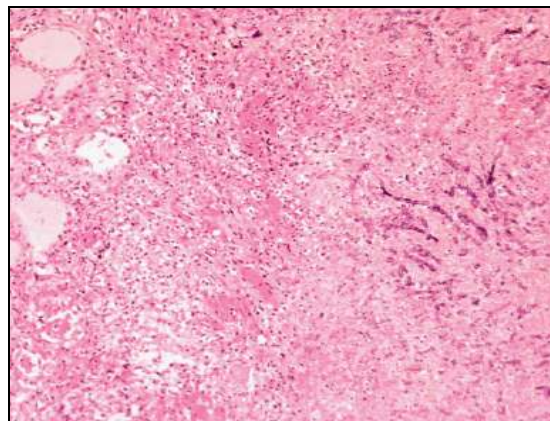


Figura 2. *A. fumigatus* numa amostra de biópsia pulmonar (H&E; x100) (retirado de Tarrand *et al.*, 2003)

O isolamento de *Aspergillus* a partir de amostras do tracto respiratório inferior revela um razoável valor predictivo positivo (>60%), mas baixa sensibilidade (<30%), para o diagnóstico de AI em doentes imunocomprometidos (Chamilos & Kontoyiannis, 2006). Permite a identificação da espécie de forma relativamente simples, assim como a realização de provas de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos (Hope *et al.*, 2005b; McClenny, 2005; Chamilos & Kontoyiannis, 2006). *A. fumigatus* não é exigente a nível nutricional e é termotolerante, apresentando um crescimento rápido a temperaturas superiores a 37°C e formando colónias verde-azuladas ou verde-acinzentadas em meios de

cultura selectivos para fungos (Figura 3) ou em meios comumente utilizados para isolamento bacteriano, com excepção daqueles contendo cicloheximida por poderem inibir o seu crescimento (Abarca, 2000; Araujo & Rodrigues, 2004; Hope *et al.*, 2005b; McClenny, 2005; Rhodes, 2006). No entanto, uma cultura positiva não permite a distinção entre colonização, infecção ou mesmo contaminação (Soubani *et al.*, 2004; McClenny, 2005; Alexander & Pfaller, 2006). De facto, e uma vez que o *A. fumigatus* é ubíquo na natureza (Latgé, 1999), o seu isolamento mesmo a partir de amostras do tracto respiratório inferior pode representar apenas colonização do mesmo. Do mesmo modo, a contaminação das amostras ou das culturas por conídios de *A. fumigatus* presentes no meio ambiente, pode confundir a interpretação do resultado cultural (Tarrand *et al.*, 2003; McClenny, 2005; Alexander & Pfaller, 2006). Nestes casos, a visualização directa de elementos fúngicos nos tecidos auxilia na clarificação do significado do isolamento de *A. fumigatus* a partir de culturas de amostras do tracto respiratório inferior (McClenny, 2005; Alexander & Pfaller, 2006).

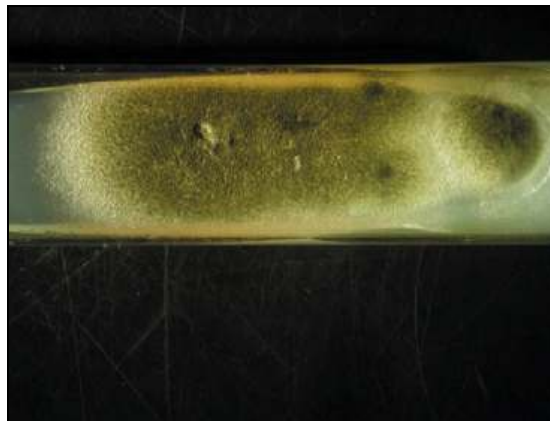


Figura 3. Colónias de *A. fumigatus* com 7 dias de cultura em Sabouraud dextrose agar em rampa (retirado de Mennink-Kersten *et al.*, 2004)

Outro importante problema das culturas é o facto destas positivarem tardiamente no curso clínico da AI (Tarrand *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2005b; McClenny, 2005). O valor predictivo da cultura aumenta ao obterem-se culturas com múltiplas colónias ou quando se

verifica o isolamento em amostras sequenciais dos mesmos doentes (McClenny, 2005). O valor predictivo também depende dos factores de risco do doente. Perfect *et al.* (2001) observaram que nos doentes com risco elevado (receptores de transplante alogénico de medula óssea, doentes neutropénicos e doentes hemato-oncológicos), uma cultura positiva se associa com AI em 50-64% dos casos, enquanto que naqueles com risco intermédio (receptores de transplante de órgãos sólidos, receptores de transplante autólogo de medula óssea, doentes sujeitos a tratamentos prolongados com doses elevadas de glucocorticóides, doentes infectados com VIH ou com doença pulmonar), esse valor descia para 8-28%.

O isolamento de *Aspergillus* a partir de hemoculturas apresenta uma sensibilidade de apenas 50% no diagnóstico de fungemia (Meyer *et al.*, 2004), tendo um muito escasso valor no diagnóstico da AI (Kontoyiannis *et al.*, 2000; Chamilos & Kontoyiannis, 2006). Apesar de se tratar de uma infecção invasiva frequentemente com disseminação sistémica, verificam-se resultados positivos de hemoculturas em apenas 5% dos casos de AI. Considera-se que uma verdadeira aspergilemia (*Aspergillus* spp. no sangue) é rara mesmo em doentes com factores de risco, ocorrendo apenas tardiamente no decurso da doença e quase exclusivamente em doentes hemato-oncológicos (Kontoyiannis *et al.*, 2000; Simoneau *et al.*, 2005; Alexander & Pfaller, 2006).

No decurso da última década, as hemoculturas tornaram-se num dos procedimentos diagnósticos mais importantes e mais frequentemente realizados nos laboratórios de microbiologia (Fuller *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004). Os avanços relacionados com a capacidade cultural dos fungos têm sido centrados na recuperação destes a partir de amostras de sangue (Alexander & Pfaller, 2006). Assim, vários sistemas automatizados, recorrendo a diversos meios líquidos de cultura, onde a amostra possa ser inoculada directamente e onde o risco de contaminação é mínimo, têm sido desenvolvidos com o objectivo de aumentar a sensibilidade e a rapidez de detecção de crescimento dos agentes microbianos responsáveis por bacteremia ou fungemia (Fuller *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004; Alexander & Pfaller, 2006); é o caso dos equipamentos BACTEC™ 9240 e BACTEC™ 9000 MB (Becton Dickinson and Company, Sparks, Estados Unidos). Tratam-se de sistemas automatizados não invasivos que incubam, agitam e monitorizam continuamente vários meios de cultura líquidos para a detecção rápida de crescimento microbiano em amostras de sangue ou de outros fluidos corporais normalmente

amicrobianos (Archibald *et al.*, 2000; Sorlin *al.*, 2000; Fuller *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004). Vários frascos de cultura BACTEC™ podem ser utilizados. Os mais comuns são: BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Plus Anaerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic (Becton Dickinson and Company), cada um correspondendo a uma distinta formulação de meio de cultura, selectivo ou não, para o isolamento de microrganismos aeróbios e microaerofílicos, anaeróbios, fungos e micobactérias, respectivamente (Fuller *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004). O BACTEC™ Peds Plus/F (Becton Dickinson and Company) é utilizado para a cultura e o isolamento de microrganismos aeróbios e microaerofílicos a partir de amostras de sangue pediátricas ou de outros fluidos corporais normalmente amicrobianos de volume inferior a 3mL (Hughes *et al.*, 2001). Cada frasco de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Plus Anaerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Peds Plus/F contém no seu fundo um sensor fluorescente capaz de detectar aumento de dióxido de carbono (CO₂) ou, no caso do BACTEC™ Myco/F Lytic, diminuição na concentração de oxigénio (O₂) resultantes do metabolismo e crescimento dos microrganismos. A cada 10 minutos, o sensor é monitorizado em todos os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Plus Anaerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Peds Plus/F pelo equipamento BACTEC™ 9240 e nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic pelo equipamento BACTEC™ 9000 MB, relativamente ao aumento de fluorescência, o qual é proporcional à quantidade de CO₂ produzida ou à quantidade de O₂ consumida pelos microrganismos, respectivamente. Os dados coligidos são transmitidos a um computador e analisados, sendo indicados, através de sinais luminosos e alarmes sonoros, os frascos de cultura BACTEC™ positivos que são detectados em cada leitura (Archibald *et al.*, 2000; Sorlin *al.*, 2000; Fuller *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004). Segundo as indicações do fabricante, uma leitura positiva indica a presença presuntiva de microrganismos viáveis que deve ser confirmada por exame microscópico directo e subcultura em meio de cultura sólido. De seguida, decorrerá a identificação e/ou realização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

1.3.2 Diagnóstico indirecto

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Aspergillus* parece não ter utilidade no diagnóstico da AI em doentes neutropénicos e em receptores de transplante de medula óssea, principalmente pela sua incapacidade de resposta imunológica atempada ou adequada (Maertens *et al.*, 2007b). No entanto, a sua detecção pode vir a ter utilidade noutros grupos de risco, mas ainda carece de validação clínica (Maertens *et al.*, 2007b).

1.3.3 Pesquisa de antígenos

O *A. fumigatus* apresenta mais de 100 componentes antigénicos, sendo os de maior utilidade diagnóstica em doentes com factores de risco de AI o galactomanano (GM) e o (1→3)-β-D-glucano (BG) (Latgé, 1999).

1.3.3.1 Detecção de galactomanano

O galactomanano (GM) é um polissacárido da parede celular do género *Aspergillus*, sendo o principal antígeno solúvel libertado durante a invasão tecidular (Latgé, 1999). A sua detecção no plasma, no soro, no lavado bronco-alveolar ou no líquido cefalorraquidiano é considerada uma evidência micológica segundo as definições EORTC/MSG para DFI (Ascioglu *et al.*, 2002; De Pauw *et al.*, 2008). Actualmente, é amplamente utilizado o método comercial Platelia™ *Aspergillus* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França), uma técnica de “Enzyme Immunoassay” (EIA) em “sanduiche”, que foi introduzida na Europa nos anos noventa e aprovada pela “Food and Drug Administration” (FDA) nos Estados Unidos em 2003 (Aquino *et al.*, 2007; Maertens *et al.*, 2007a e 2007b).

Este método utiliza um anticorpo monoclonal de rato (uma imunoglobulina M) específico, EB-A2, que reconhece as cadeias laterais (1→5)-β-D-galactofuranose da molécula de GM (Aquino *et al.*, 2007; Maertens *et al.*, 2007b) e apresenta uma boa reprodutibilidade entre laboratórios (Upton *et al.*, 2005).

Numa meta-análise baseada em dados de 27 publicações (Pfeiffer *et al.*, 2006), a detecção de GM em casos de AI provada ou provável, demonstrou uma sensibilidade média de 61-71%, com uma especificidade de 89-93%, um valor predictivo positivo de 26-53% e um valor predictivo negativo de 95-98%. A detecção de GM demonstrou ser muito mais sensível em doentes hemato-oncológicos e em receptores de transplante alogénico de medula óssea, comparativamente a receptores de transplante de órgãos sólidos (Pfeiffer *et al.*, 2006). Por outro lado, o valor de cut-off para positividade é outra importante variável que influencia muito a sensibilidade do método (Aquino *et al.*, 2007; Maertens *et al.*, 2007a e 2007b). Assim, apesar de ter sido originalmente recomendado um cut-off de 1,5 quando o Platelia™ *Aspergillus* foi introduzido na Europa, a mesma casa comercial aconselhou um cut-off inferior de 0,5 quando foi comercializado nos Estados Unidos, sendo este o valor actualmente utilizado na Europa (Aquino *et al.*, 2007; Maertens *et al.*, 2007a e 2007b). Ao aumentar-se o número de casos positivos como resultado da diminuição do cut-off de 1,5 para 0,5, a sensibilidade diagnóstica aumenta significativamente de 21% (passando de 76,3% para 97,4%), com uma consequente descida de especificidade de 7% (passando de 97,5% para 90,5%) (Maertens *et al.*, 2007a). Assim, verificou-se na análise retrospectiva dos valores de GM em 239 episódios de doentes adultos neutropénicos e receptores de transplante alogénico de medula óssea, obtidos em duas amostras consecutivas com um valor cut-off de 0,5, uma sensibilidade de 92,1%, uma especificidade de 97,5%, um valor predictivo positivo de 87,5% e um valor predictivo negativo de 98,5%. Além disso, verificou-se nesse estudo (Maertens *et al.*, 2007a), que em 65% dos doentes com AI, o GM positivava uma semana antes de se estabelecer o diagnóstico de AI e na mesma semana em 79,5% dos casos. Um estudo prospectivo recente de Penack *et al.* (2008) demonstrou que a detecção de GM por EIA no lavado bronco-alveolar tinha uma sensibilidade acrescida em relação à sua detecção no soro, elevando-se de 71% para 100%.

O GM também demonstrou ser bastante útil na implementação de uma estratégia terapêutica precoce adequada em doentes com AI (Maertens *et al.*, 2005). Além disso, a detecção de índices quantitativos de GM correlaciona-se com a resposta à terapêutica antifúngica, baixando com rapidez quando o tratamento é eficaz e o prognóstico dos doentes melhora (Anaissie, 2007; Aquino *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2007; Woods *et al.*, 2007). No entanto, mostram-se necessários estudos adicionais para validar clinicamente o uso do GM com esse objectivo (Del Bono *et al.*, 2008).

A incidência de resultados falso-positivos varia de aproximadamente 5% em adultos até 83% na população pediátrica (Sulahian *et al.*, 2001; Herbrecht *et al.*, 2002; Maertens *et al.*, 2002; Mennink-Kersten *et al.*, 2004). Os resultados falso-positivos de GM têm sido observados principalmente na colonização gastrointestinal frequente em neonatos com *Bifidobacterium* spp., devido ao ácido lipoteicoico (Mennink-Kersten *et al.*, 2005), em doentes neutropénicos com mucosite intensa devida à quimioterapia (especialmente com ingestão de cereais e leite materno) (Maertens *et al.*, 2002) ou com bacteremia (Maertens *et al.*, 2004), em receptores de transplante alogénico de medula óssea ou naqueles com doença do enxerto-versus-hospedeiro crónica (Asano-Mori *et al.*, 2008) e com a presença de GM em certos alimentos (Murashige *et al.*, 2005). Os resultados falso-positivos podem ainda estar associados a antibióticos intravenosos, tais como piperacilina-tazobactam (Aubry *et al.*, 2006; Alhambra *et al.*, 2007) e amoxicilina-ácido clavulânico (Aubry *et al.*, 2006; Zandijk *et al.*, 2008) e ao uso de soluções endovenosas, como o Plasma-Lyte, o qual também é utilizado na obtenção dos lavados bronco-alveolares (Hage *et al.*, 2007; Racil *et al.*, 2007). Foram ainda descritas reacções cruzadas com outros fungos, tais como *Geotrichum capitatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Nigrospora oryzae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum* ou *Trichothecium roseum* (Giacchino *et al.*, 2006; Cummings *et al.*, 2007; Wheat *et al.*, 2007). Receptores de transplante de fígado e doentes com patologia auto-imune do fígado têm maior probabilidade de terem resultados falso-positivos, assim como doentes em hemodiálise (Kwak *et al.*, 2004; El Saleeby *et al.*, 2005).

A ocorrência de resultados falso-negativos é determinada pela presença de anticorpos anti-*Aspergillus* e, principalmente, pela administração profiláctica ou empírica de antifúngicos com actividade anti-*Aspergillus* (Aquino *et al.*, 2007; Maertens *et al.*,

2007b). No entanto, ao utilizar-se o cut-off de 0,5, a taxa de falso-negativos é baixa, tal como foi já demonstrado por Marr *et al.* (2005).

1.3.3.2 Detecção de (1→3)-β-D-glucano

O (1→3)-β-D-glucano (BG) é um componente major da parede celular da maioria dos fungos com exceção de *Cryptococcus* spp. e dos Zygomycetes; outros microrganismos patogénicos, dos protozoários aos vírus, e animais, incluindo humanos, são desprovidos desse polissacárido (Marty & Koo, 2008; Obayashi *et al.*, 2008). A sua presença no soro demonstrou ser comparável ou até mais sensível do que a de GM para o diagnóstico de DFI, incluindo AI (Khan *et al.*, 2008; Persat *et al.*, 2008), fazendo actualmente também parte dos critérios micológicos para o diagnóstico das DFI, segundo as definições EORTC/MSG (Ascioglu *et al.*, 2002; De Pauw *et al.*, 2008). Estão disponíveis três ensaios comerciais: Fungitec G-Test MK™ (Seikagaku Kogyo Corporation, Tokyo, Japão), um método colorimétrico cinético; β-glucan Test Wako™ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japão), um método turbidimétrico cinético; e Fungitell™ (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, Estados Unidos; antigo GlucateLL™), um método colorimétrico cinético aprovado pela FDA em 2004 (Maertens *et al.*, 2007b; Marty & Koo, 2008; Obayashi *et al.*, 2008). Porém, os resultados obtidos com estes métodos são completamente incomparáveis entre eles uma vez que usam diferentes padrões de BG, assim como diferentes espécies de “caranguejo-ferradura” como reagente, as quais apresentam distintas reactividades com o BG e, conseqüentemente, diferentes valores de cut-off (Obayashi *et al.*, 2008).

Num estudo realizado por Obayashi *et al.* (2008), com 456 autópsias que envolviam casos de DFI, a avaliação do BG pelo Fungitec G-Test MK™ provou ser eficaz no diagnóstico destas doenças, mesmo utilizando valores de cut-off tão elevados como 80 pg/mL. A sensibilidade é de 85,4% e de 78%, a especificidade de 95,2% e de 98,4%, com um valor predictivo positivo de 70,4% e de 86,7% e um valor predictivo negativo de 98% e

de 97,1%, respectivamente para valores cut-off de 60 e de 80 pg/mL. No estudo prospectivo de Senn *et al.* (2008), envolvendo 190 doentes neutropénicos e recorrendo ao β -glucan Test WakoTM, demonstrou-se que com dois valores consecutivos de BG ≥ 7 pg/mL se obtinham os melhores resultados para a detecção de DFI em doentes com leucemia aguda sujeitos a quimioterapia mielossupressiva, com uma sensibilidade de 63%, especificidade de 96%, valor predictivo positivo de 79% e valor predictivo negativo de 91%. Num estudo prospectivo de Odabasi *et al.* (2004) envolvendo 20 doentes com DFI provada ou provável, verificou-se uma sensibilidade de 65% e uma especificidade de 96%, utilizando o FungitellTM (GlucateLLTM) e dois valores sequenciais ≥ 60 pg/mL. Verificou-se ainda que estes resultados positivos precediam o diagnóstico clínico de DFI provada ou provável em cerca de 10 dias. No entanto, parece ainda haver escassez de estudos prospectivos sobre o papel do BG no estabelecimento do diagnóstico de AI nas distintas subpopulações de doentes com diferentes factores de risco (Del Bono *et al.*, 2008).

O BG parece também ser um marcador útil na monitorização do tratamento antifúngico em doentes com AI, apesar de ser ainda necessário ampliar a experiência clínica disponível (Pazos *et al.*, 2005; Marty & Koo, 2008; Wiederhold *et al.*, 2008). Assim, a presença ou o aumento de BG no sangue em doentes com AI submetidos a tratamento antifúngico parece indicar falta de resposta ao mesmo. Pelo contrário, valores sequencialmente descendentes parecem estar associados a uma melhoria do prognóstico (Pazos *et al.*, 2005).

Todavia, verificam-se resultados falso-positivos em doentes em hemodiálise com membranas de celulose (Kanda *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2001), em doentes recebendo imunoglobulina humana intravenosa (Ogawa *et al.*, 2004) ou outros componentes sanguíneos, devido à contaminação pelos filtros de celulose utilizados durante o seu processo de fabrico (Usami *et al.*, 2002; Nagasawa *et al.*, 2003), ou medicados com alguns antibacterianos injectáveis (Marty *et al.*, 2006; Mennink-Kersten *et al.*, 2006b) e ainda em doentes cirúrgicos expostos a gaze ou outros materiais contendo BG (Nakao *et al.*, 1997). O soro hemolisado também origina resultados falso-positivos. Inversamente, níveis elevados de bilirrubina e de triglicérideos estão associados a resultados falso-negativos (Pickering *et al.*, 2005). É ainda necessário ter em conta que a manipulação de material de

laboratório não livre de BG pode dar lugar a contaminações e, deste modo, a falsas positivities (Pickering *et al.*, 2005).

1.3.4 Diagnóstico molecular

Na última década, têm sido desenvolvidas várias tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos com o objectivo de garantir um diagnóstico atempado da AI e a simultânea identificação da espécie fúngica envolvida, sendo provavelmente a área mais promissora do diagnóstico da AI (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007; Spiess *et al.*, 2007; Fréalle *et al.*, 2008; Khot *et al.*, 2008; Perlin & Zhao, 2008; Suarez *et al.*, 2008). Uma nova geração de metodologias tem surgido, melhorando significativamente a detecção de DNA ou RNA específico de *Aspergillus* spp. a partir de amostras do tracto respiratório inferior, de soro, de plasma, de sangue total ou de tecidos (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007; Fréalle *et al.*, 2008; Perlin & Zhao, 2008; Suarez *et al.*, 2008). A reacção da polimerase em cadeia (PCR) continua a ser a técnica mais promissora, especialmente quando acoplada à metodologia em tempo real (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007; Fréalle *et al.*, 2008; Khot *et al.*, 2008; Perlin & Zhao, 2008; Suarez *et al.*, 2008). Tuon (2007), numa revisão sistemática das publicações sobre o diagnóstico da AI por PCR em amostras de lavado bronco-alveolar, mostrou um valor de sensibilidade e de especificidade de 79% e de 94%, respectivamente. O PCR em tempo real mostrou ser aproximadamente 20 vezes mais sensível que a cultura (Loeffler *et al.*, 2002) e foram obtidas sensibilidades elevadas, de <1 pg de DNA ou 1-10 unidades formadoras de colónias (UFC) por mL de sangue ou por gr de tecido, em amostras de sangue, do tracto respiratório inferior e de tecidos (Perlin & Zhao, 2008). As sequências-alvo mais amplamente utilizadas são os genes RNA ribossómicos fúngicos (rRNA) e as “Internal Transcribed Spacer Regions”, regiões ITS1 ou ITS2, o que permite a identificação a nível do género e da espécie ou só da espécie, respectivamente (Perlin & Zhao, 2008). O PCR em tempo real apresenta ainda como vantagens para a detecção de *Aspergillus* spp. a rapidez de obtenção dos resultados e a

quantificação do DNA microbial da amostra clínica (Khot *et al.*, 2008). No entanto, o PCR não permite a distinção entre infecção e colonização (a omnipresente dúvida associada às DFI), bem como é incapaz de definir a viabilidade dos microrganismos (Chamilos & Kontoyiannis, 2006; Perlin & Zhao, 2008). Acresce ainda o facto da reprodutibilidade interlaboratorial dos resultados de PCR ainda não ser possível, uma vez que os diversos laboratórios usam protocolos, primers, técnicas de extracção de DNA, estratégias de amplificação, reagentes e amostras clínicas diferentes. Até à data e dado que nenhuma técnica foi clinicamente validada e padronizada ou está comercialmente disponível (Donnelly, 2006; Khot *et al.*, 2008; Perlin & Zhao, 2008), o PCR ainda não foi incluído nas definições EORTC/MSG para DFI (De Pauw *et al.*, 2008). Além disso, a superioridade dos ensaios baseados em PCR relativamente à detecção de antígenos no diagnóstico da AI na sua fase inicial, ainda não foi estabelecida (Mennink-Kersten *et al.*, 2006a). Resultados falso-positivos podem ocorrer devido à introdução de contaminação durante uma qualquer fase do procedimento. Resultados falso-negativos verificam-se com a extracção sub-ótima de DNA (baixa recuperação de DNA e/ou a presença de inibidores de PCR), elevadas quantidades de DNA genómico humano competindo com o alvo microbiano para a amplificação e baixa sensibilidade analítica da própria reacção de PCR (Paterson, 2007; Khot *et al.*, 2008).

1.4 Tratamento e susceptibilidade aos antifúngicos

A última década deu lugar a uma considerável expansão na investigação farmacológica antifúngica e desenvolvimento clínico de vários compostos, bem como no estabelecimento de novas estratégias para o tratamento da 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 (VRC) e posaconazole (PSC) e a equinocandina caspofungina (CPF) são compostos que

foram licenciados para o tratamento da AI, tendo actividade *in vitro* e *in vivo* devidamente comprovada sobre as distintas espécies do género *Aspergillus* (Walsh *et al.*, 2008).

Recentemente, foram publicadas pela “Infectious Diseases Society of America” (IDSA) “guidelines” para a prática clínica com o objectivo de resumir a evidência actual sobre recomendações terapêuticas das três principais formas de aspergilose: AI, formas crónicas de aspergilose e formas alérgicas de aspergilose (Walsh *et al.*, 2008). Segundo essas “guidelines”, o início precoce da terapia antifúngica em doentes com forte suspeita de AI é justificada enquanto decorre a avaliação diagnóstica. Assim, para o tratamento primário da AI é recomendado o VRC, por via oral ou por via intravenosa para doentes mais graves. Em alguns doentes, a AMB lipossómica pode ser considerada como alternativa no tratamento primário. No tratamento de último recurso, podem ser utilizadas formulações lipídicas de AMB, o PSC, o ITC e a CPF. Na AI resistente ao VRC, dispõe-se como opções terapêuticas de uma formulação de AMB ou de uma equinocandina, como a CPF; a maior utilização de azoles deve ter em consideração o tratamento prévio com esse tipo de fármacos, factores relacionados com o doente e aspectos farmacocinéticos. A administração de um tratamento combinado não é recomendada como tratamento primário de rotina, sendo apenas de considerar num contexto de tratamento de último recurso em que outro agente antifúngico pode ser adicionado ao fármaco em curso ou em que uma combinação de fármacos antifúngicos de classes diferentes às do regime inicial pode ser empregue. Relativamente à duração do tratamento antifúngico, esta ainda não se encontra bem definida, sendo contudo recomendado que se prolongue durante um mínimo de 6 a 12 semanas. Nos casos de doentes tratados com sucesso que necessitem de subsequente imunossupressão, o recomeço do tratamento antifúngico pode prevenir uma infecção recorrente. O PSC é recomendado como profilaxia antifúngica em doentes com factores de risco de AI, receptores de transplante de medula óssea com doença do enxerto-versus-hospedeiro ou doentes com leucemia mielóide aguda ou síndrome mielodisplásico.

Apesar das novas estratégias para o tratamento da AI e das várias alternativas antifúngicas disponíveis, alguns episódios de AI continuam difíceis de tratar (Walsh *et al.*, 2008). Segundo um estudo de Wingard *et al.* (2008), a maioria das mortes devidas a AI ocorrem durante as primeiras seis semanas do início da terapêutica, devendo ser este o melhor intervalo para avaliar a eficácia do tratamento antifúngico uma vez que a maioria

das mortes que ocorrem depois desse intervalo de tempo são principalmente devidas à doença subjacente e sua terapia, mais do que à própria AI. Neste contexto, a investigação farmacológica antifúngica continua, com o desenvolvimento clínico de novos fármacos: isavuconazole, ravuconazole, albaconazole, micafungina, anidulafungina e aminocandina (Pasqualotto & Denning, 2008; Sabol & Gumbo, 2008; Walsh *et al.*, 2008).

As principais razões apontadas para o fracasso do tratamento da AI incluem o sistema imunitário deficitário ou suprimido dos doentes, a baixa biodisponibilidade dos fármacos, as reacções adversas e interacções medicamentosas e a resistência de algumas estirpes de *Aspergillus* aos antifúngicos, que tem vindo a assumir uma importância crescente (Pasqualotto & Denning, 2008; Qiao *et al.*, 2008). De facto, desde a primeira notificação (Denning *et al.*, 1997) de estirpes de *A. fumigatus* resistentes ao ITC, o número de estirpes clínicas de *A. fumigatus* resistentes aos triazoles tem aumentado consideravelmente (Araujo, 2007; Qiao *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2008). Neste contexto, a avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* tem-se tornado uma prática mais comum e com reconhecido valor. Recentemente, o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2008) publicou um método padronizado de microdiluição em meio líquido (M38-A2), para a avaliação da susceptibilidade de fungos filamentosos. O M38-A2 permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e, apesar de trabalhoso e de oferecer resultados em apenas 48h, garante a reprodutibilidade dos resultados, pelo menos relativamente aos triazoles e à AMB. Para a avaliação da susceptibilidade à CPF, é determinada a concentração efectiva mínima (CEM). Outros métodos de avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos, tais como *E*-test, método de difusão com discos em agar (Araujo, 2007; Espinel-Ingroff *et al.*, 2007; Ozkutuk *et al.*, 2008), métodos colorimétricos (Meletiadis *et al.*, 2001; Antachopoulos *et al.*, 2007) podem ainda ser utilizados com algumas vantagens mas não isentos de problemas técnicos. A citometria de fluxo que se revelou muito promissora relativamente à determinação da susceptibilidade a leveduras já foi testada para fungos filamentosos (Balajee & Marr, 2002; Vale-Silva & Buchta, 2006; Araujo, 2007). Todavia, ainda não estão disponíveis “breakpoints” definitivos de concentração antifúngica que traduzem resistência de fungos filamentosos relativamente aos vários antifúngicos (Espinel-Ingroff *et al.*, 2007).

2 Objectivos

Apesar de *A. fumigatus* não ser particularmente exigente a nível nutricional, ser termotolerante e apresentar um crescimento relativamente rápido na maioria dos meios de cultura comumente utilizados nos laboratórios de microbiologia, ainda não se consegue compreender porque a sua recuperação a partir de hemoculturas é tão rara.

Este trabalho teve como objectivos:

1. Comparar três distintos frascos de hemocultura dos sistemas automatizados BACTEC™: BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic, em termos de sensibilidade e tempo de detecção de crescimento de *A. fumigatus*.
2. Estudar a possível influência da presença concomitante de outros microrganismos, tais como bactérias Gram positivo e Gram negativo e leveduras, na detecção de *A. fumigatus* pelos mesmos equipamentos.
3. Identificar a hipotética interferência de alguns antifúngicos na recuperação de *A. fumigatus* pelos mesmos equipamentos.
4. Avaliar a eficácia de detecção dos sistemas automatizados BACTEC™ após repicagem em meio de cultura sólido dos frascos de cultura BACTEC™ cujo resultado foi positivo.

3 Materiais e Métodos

3.1 Estirpes fúngicas

Utilizaram-se 3 isolados clínicos de *A. fumigatus*, obtidos da colecção fúngica do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (Portugal). Neste estudo, incluiu-se também a estirpe de referência *A. fumigatus* ATCC 46645 pertencente à colecção “American Type Culture Collection” (ATCC). Os conídios de cada estirpe, com 7 dias de cultura, tinham sido ressuspensos em caldo Brain Heart Infusion (Difco, Detroit, Estados Unidos) com 5% de glicerol (Merck, Rahway, Estados Unidos) e conservados a -70°C . Quando necessário, descongelaram-se e cultivaram-se em meio Sabouraud dextrose agar (Difco) a 35°C durante 7 dias. Recolheram-se as suspensões de conídios após adicionar 10 mL de tampão fosfato salino estéril (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) à rampa de Sabouraud dextrose agar e leve agitação para ressuspensão. A concentração de conídios em suspensão avaliou-se por leitura óptica num fotómetro Densimat[®] (bioMérieux SA, Marcy l’Etoile, França), como descrito em estudo prévio (Araujo *et al.*, 2004), sendo ajustada com PBS estéril para se obterem suspensões com concentrações seriadas de 5 a 10^4 conídios/mL. Estas concentrações comprovaram-se após cultura em meio gelose Sabouraud gentamicina cloranfenicol (bioMérieux) a 35°C e contagem de colónias ao fim de 48 h de incubação.

3.2 Inoculação dos frascos de cultura BACTEC™

As suspensões de conídios de *A. fumigatus* com concentrações seriadas inocularam-se asépticamente nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic (Figura 4), de acordo com as recomendações do fabricante, obtendo-se concentrações seriadas finais de 0,1 a 250 conídios/mL. Os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F contêm um meio líquido de digerido de soja-caseína, enriquecido com extracto de levedura, açúcares específicos (sacarose e dextrose), hemina, vitaminas K3 e B6, polianetolsulfonato de sódio (SPS); adicionalmente contêm resinas adsorventes e resinas de troca catiónica, para neutralizar antimicrobianos. O meio dos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F é composto por uma mistura de caldo Brain Heart Infusion com meio líquido de digerido de soja-caseína, enriquecido com extracto de levedura, açúcares específicos (sacarose e dextrose), inositol, saponina, citrato férrico de amónio, SPS e antimicrobianos (cloranfenicol e tobramicina) para inibir o crescimento bacteriano. Os frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic são constituídos por uma mistura de meio líquido Middlebrook 7H9 modificado e caldo Brain Heart Infusion, enriquecido com hidrolisado de caseína, inositol, glicerol, vitaminas H e B6, saponina, citrato férrico de amónio, fosfato de potássio, SPS e Tween 80. De cada série distinta de frascos de cultura BACTEC™, inoculou-se um com PBS estéril, servindo como controlo negativo em cada ensaio. Todos os ensaios realizaram-se em triplicado.

Outra série de frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e de BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculou-se asépticamente com 8 mL de sangue total (colhido por punção venosa com técnica asséptica, de voluntários adultos saudáveis com consentimento informado) e os frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic com 4 mL, segundo as recomendações do fabricante; seguidamente inocularam-se as suspensões de conídios de *A. fumigatus*, com concentrações seriadas, sempre em triplicado. De cada série distinta de frascos de cultura BACTEC™, inoculou-se um apenas com sangue e outro somente com PBS estéril, servindo como controlos negativos em cada ensaio.



Figura 4. Frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F, BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Myco/F Lytic (da esquerda para a direita)

3.3 Inoculação concomitante com outros microrganismos

Avaliou-se a interferência da presença concomitante de outros microrganismos na detecção e recuperação de *A. fumigatus* a partir dos frascos de cultura BACTEC™. Utilizaram-se as seguintes estirpes de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Candida albicans* ATCC 10231. Estes agentes etiológicos são frequentemente responsáveis por bacteremia e fungemia em doentes críticos (Hidron *et al.*, 2008). Estas estirpes conservaram-se a -70°C, após preparação de suspensão em caldo Brain Heart Infusion com 5% de glicerol. Quando necessário, descongelaram-se e cultivaram-se em meio Brain Heart Infusion agar (Difco) a 35°C durante 24 h, por duas vezes, para garantir o isolamento em cultura pura. Prepararam-se suspensões de cada estirpe em PBS estéril; a avaliação da sua concentração realizou-se num fotómetro Densimat®, sendo ajustada com PBS estéril para uma turvação equivalente a 0,5 unidades MacFarland (aproximadamente 10⁸ UFC/mL para *S. aureus* e *E. coli* e 10⁶ UFC/mL para *C. albicans*), sendo posteriormente diluídas com PBS estéril.

Suspensões de conídios de uma estirpe de *A. fumigatus*, com concentrações seriadas, inocularam-se assepticamente nos frascos de cultura BACTEC™, como anteriormente descrito; posteriormente inocularam-se suspensões de i) *S. aureus*, numa

concentração final de 3 UFC/mL; ii) *E. coli*, numa concentração final 0,3 UFC /mL; e iii) *C. albicans*, numa concentração final 0,3 UFC /mL; sempre em triplicado. Estas concentrações finais comprovaram-se após cultura em meio gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro a 35°C e contagem de colónias ao fim de 48 h de incubação. De cada série de frascos de cultura BACTEC™, inoculou-se um com PBS estéril, servindo como controlo negativo em cada ensaio. As concentrações microbianas ensaiadas são normalmente as verificadas no decurso de episódios de bacteremia ou de fungemia em doentes críticos (Bouza *et al.*, 2007) e, simultaneamente, são aquelas que, após optimização, apresentam um tempo de detecção mais próximo do tempo de detecção (cerca de 21 h) obtido a partir dos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados com uma suspensão de conídios de *A. fumigatus* com uma concentração final de 250 conídios/mL (cerca de 18 h para *S. aureus*, 11 h para *E. coli* e 26 h para *C. albicans*, nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F).

3.4 Inoculação concomitante com antifúngicos

Avaliou-se a susceptibilidade de uma estirpe de *A. fumigatus* em relação à anfotericina B (AMB; Bristol-Myers Squibb, New York, Estados Unidos), à caspofungina (CPF; Merck), ao posaconazole (PSC; Schering-Plough, New Jersey, Estados Unidos) e ao voriconazole (VRC; Pfizer, New York, Estados Unidos), de acordo com o protocolo M38-A2 do CLSI (CLSI, 2008). A AMB e a CPF diluíram-se em água estéril e o PSC e o VRC em dimetilsulfóxido (DMSO; Merck), de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) da AMB, do PSC e do VRC e determinou-se a concentração efectiva mínima (CEM) da CPF, conforme recomendado em estudo prévio (Wiederhold *et al.*, 2004), após incubação a 35°C durante 48 h. As concentrações finais de antifúngicos variaram entre 0,03 e 16 µg/mL. A ausência visual de crescimento e a formação de hifas aberrantes vistas microscopicamente definiram a CIM e a CEM, respectivamente.

Avaliou-se em seguida a hipotética interferência da presença concomitante destes antifúngicos na detecção e recuperação de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™. Suspensões com concentrações seriadas de conídios da estirpe de *A. fumigatus* com a qual foi avaliada o padrão de susceptibilidade aos antifúngicos, inocularam-se assepticamente nos frascos de cultura BACTEC™, como descrito anteriormente; posteriormente adicionaram-se isoladamente os antifúngicos AMB, CPF, PSC e VRC, numa concentração final de 1 µg/mL; sempre em triplicado. Esta concentração representa aproximadamente a concentração sérica mínima de antifúngico normalmente considerada como necessária para o tratamento eficaz (Bajjoka *et al.*, 1999; Azanza *et al.*, 2007). De cada série de frascos de cultura BACTEC™, inoculou-se um com apenas PBS estéril, servindo como controlo negativo em cada ensaio.

3.5 Incubação nos sistemas automatizados BACTEC™

Os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F incubaram-se no equipamento BACTEC™ 9240 (Figura 5) e os frascos BACTEC™ Myco/F Lytic no equipamento BACTEC™ 9000 MB, de acordo com as recomendações do fabricante. A duração da incubação máxima foi de 7 dias para os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, de 14 dias para os frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F e de 42 dias para os frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic. A incubação decorreu sob agitação e monitorização contínua a 35°C, durante o período de incubação estabelecido ou até positivarem.



Figura 5. Incubação dos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F no equipamento BACTEC™ 9240

3.6 Repicagem dos frascos de cultura BACTEC™

Os frascos de cultura BACTEC™ sinalizados pelos sistemas automatizados BACTEC™ como presuntivamente positivos retiraram-se, tendo-se procedido à sua repicagem de acordo com as recomendações do fabricante; os tempos de detecção foram registados. A partir dos frascos de cultura presuntivamente positivos efectuaram-se sementeiras em meio gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux), que foi incubado em atmosfera com 5-10% de CO₂ durante 48 horas a 35°C.

A partir dos frascos de cultura BACTEC™ contendo culturas mistas de *A. fumigatus* com bactérias, efectuaram-se também sementeiras em meio gelose Sabouraud gentamicina cloranfenicol (bioMérieux), durante 5 dias a 25°C.

Avaliaram-se duas técnicas para a recuperação de *A. fumigatus* a partir dos frascos de cultura BACTEC™ presuntivamente positivos: i) o método de rotina (Figura 6), recorrendo-se a uma agulha (“sterile airway needle/subculture unit”; bioMérieux) e sementeira de 1-2 gotas da suspensão contida no frasco de cultura para cada subcultura, conforme as recomendações do fabricante; e ii) um novo método (Figura 7), utilizando-se uma seringa de insulina e uma alíquota de 100 µL da suspensão contida no frasco de cultura, recolhida após vigorosa agitação do mesmo.



Figura 6. Método de rotina de repicagem para a recuperação de *A. fumigatus* a partir dos frascos de cultura BACTEC™



Figura 7. Novo método de repicagem para a recuperação de *A. fumigatus* a partir dos frascos de cultura BACTEC™, utilizando-se uma seringa de insulina e uma alíquota de 100 µL da suspensão contida no frasco de cultura, recolhida após vigorosa agitação do mesmo

A identificação dos isolados de *A. fumigatus* confirmou-se pelo estudo morfológico macroscópico e microscópico, de acordo com os métodos micológicos padronizados (Klich, 2002). Na identificação dos isolados de bactérias e leveduras utilizou-se o sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux).

3.7 Tratamento de dados e análise estatística

Utilizaram-se as aplicações Excel 2000 (Microsoft Corp., New York, Estados Unidos) e SPSS 16,0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos) para a elaboração e análise dos dados, particularmente para o cálculo dos desvios padrões. Usou-se o teste ANOVA, com correcção de Bonferroni, e o teste “t-Student” para amostras emparelhadas. A comparação de dados efectuou-se com um nível de significância de 0,05.

4 Resultados

4.1 Detecção de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™

O tempo de detecção de crescimento de *A. fumigatus* foi dependente da concentração da suspensão inoculada no frasco de cultura BACTEC™; os valores mais elevados de inóculo foram os primeiros a originarem um resultado positivo (Gráfico 1). Os equipamentos BACTEC™ 9240 e BACTEC™ 9000 MB detectaram crescimento nos frascos de cultura inoculados com as suspensões de conídios de *A. fumigatus*, entre as 20,7±0,6 e 99,9±0,5 h (Gráfico 1). Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F relativamente aos tempos de detecção de *A. fumigatus* em cultura pura, estando estes compreendidos entre 20,7±0,6 e 40,4±1,2 h. O crescimento de *A. fumigatus* foi detectado significativamente mais tarde ($P < 0,001$) nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic, entre as 39,2±1,0 e 99,9±0,5 h.

O limite de detecção foi de 0,3 conídios/mL em todos os frascos de cultura BACTEC™; os frascos de cultura inoculados com concentrações finais de 0,1 conídios/mL não positivaram durante todo o período de incubação dos ensaios.

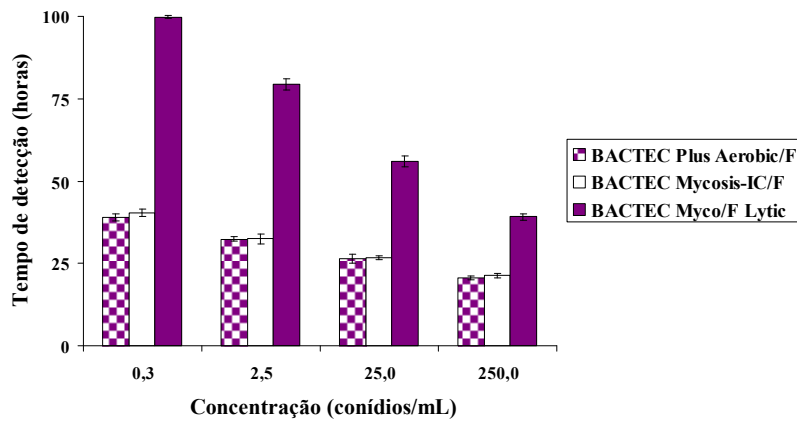


Gráfico 1. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus*, pelos equipamentos BACTEC™ 9240 e 9000 MB

Os resultados obtidos com os frascos de cultura BACTEC™ contendo sangue humano foram semelhantes ($P > 0,05$) aos descritos para os frascos de cultura inoculados apenas com as suspensões de conídios de *A. fumigatus* (Gráficos 2, 3 e 4); os tempos de detecção de crescimento de *A. fumigatus* variaram entre $21,8 \pm 0,5$ e $41,7 \pm 0,8$ h para os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F, e entre $40,2 \pm 1,5$ e $102,0 \pm 1,8$ h para os frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic.

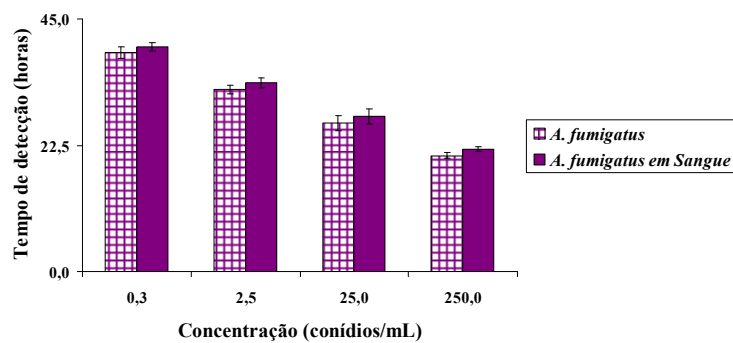


Gráfico 2. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e sangue humano, pelo equipamento BACTEC™ 9240

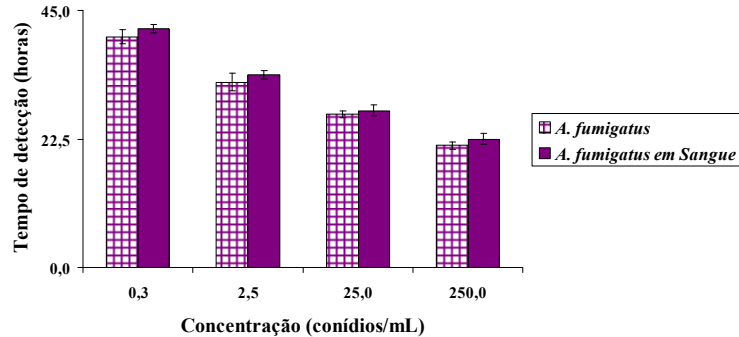


Gráfico 3. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e sangue humano, pelo equipamento BACTEC™ 9240

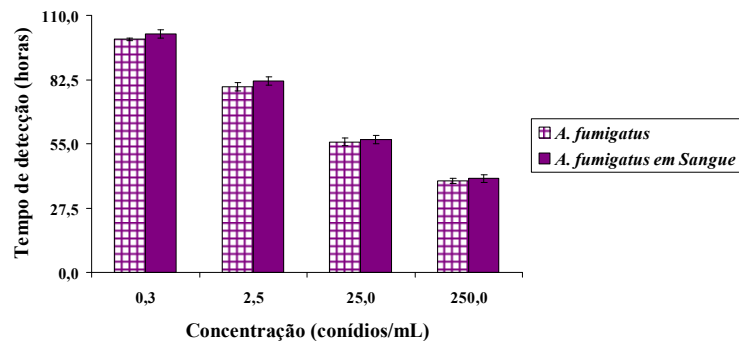


Gráfico 4. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e sangue humano, pelo equipamento BACTEC™ 9000 MB

4.2 Avaliação da presença concomitante de outros microrganismos

A presença concomitante de outros microrganismos, nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F (apenas para o caso da *C. albicans*) e BACTEC™ Myco/F Lytic, resultou em tempos de detecção de crescimento

microbiano significativamente inferiores ($P < 0,001$) aos obtidos com as culturas puras de *A. fumigatus* (Gráficos 5 e 6). Assim, os tempos de detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Myco/F Lytic foram de, respectivamente, $17,8 \pm 0,6$ h e $13,0 \pm 0,6$ h na presença de *S. aureus*, $10,5 \pm 0,2$ h e $12,4 \pm 0,1$ h na presença de *E. coli* e $25,7 \pm 1,2$ h e $23,4 \pm 1,5$ h na presença de *C. albicans*.

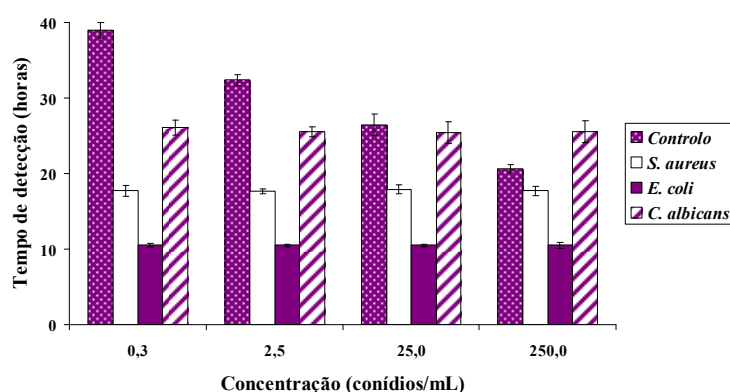


Gráfico 5. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com outros microrganismos (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*), pelo equipamento BACTEC™ 9240

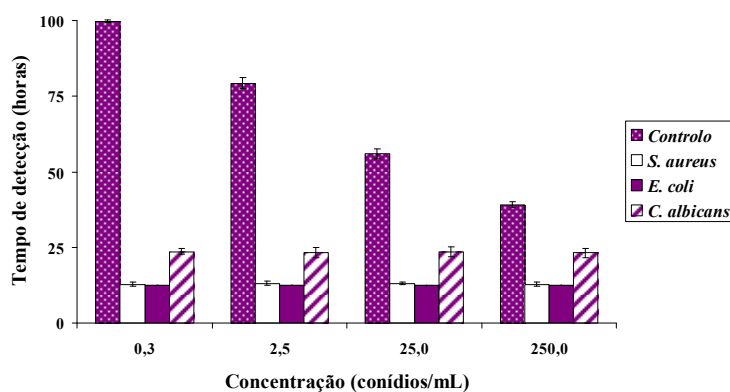


Gráfico 6. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com outros microrganismos (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*), pelo equipamento BACTEC™ 9000 MB

Os resultados obtidos com os frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados concomitantemente com bactérias Gram positivo e Gram negativo foram semelhantes ($P > 0,05$) àqueles descritos para os frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados apenas com as suspensões de conídios de *A. fumigatus*, apresentando tempos de detecção compreendidos entre $21,0 \pm 0,5$ e $40,9 \pm 0,7$ h (Gráfico 7). Relativamente aos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados concomitantemente com *C. albicans*, o tempo de detecção de crescimento foi de $18,3 \pm 0,6$ h.

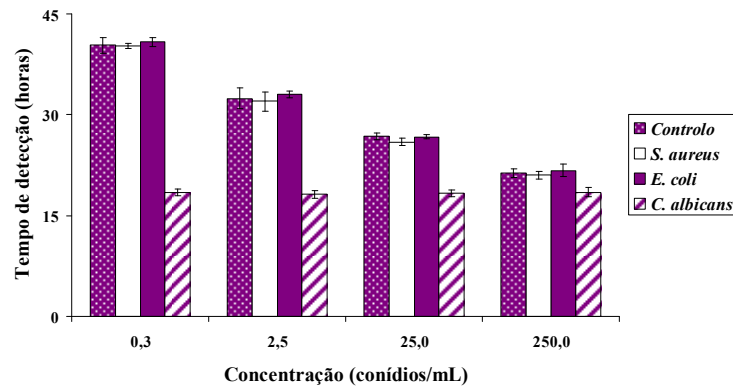


Gráfico 7. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com outros microrganismos (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*), pelo equipamento BACTEC™ 9240

4.3 Avaliação da presença concomitante de antifúngicos

A estirpe clínica de *A. fumigatus* utilizada no ensaio foi susceptível a todos os antifúngicos ensaiados; verificou-se um valor de CIM de $0,5 \mu\text{g/mL}$ à AMB, de $0,5 \mu\text{g/mL}$ à CPF, de $0,25 \mu\text{g/mL}$ ao PSC e de $0,5 \mu\text{g/mL}$ ao VRC.

Os tempos de detecção obtidos com os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F aos quais foi adicionado concomitantemente AMB, CPF, PSC e VRC foram semelhantes ($P > 0,05$) àqueles obtidos com os frascos de cultura BACTEC™ Plus

Aerobic/F sem antifúngicos, sendo *A. fumigatus* detectado entre as $21,6 \pm 0,8$ e $41,0 \pm 1,0$ h (Gráfico 8).

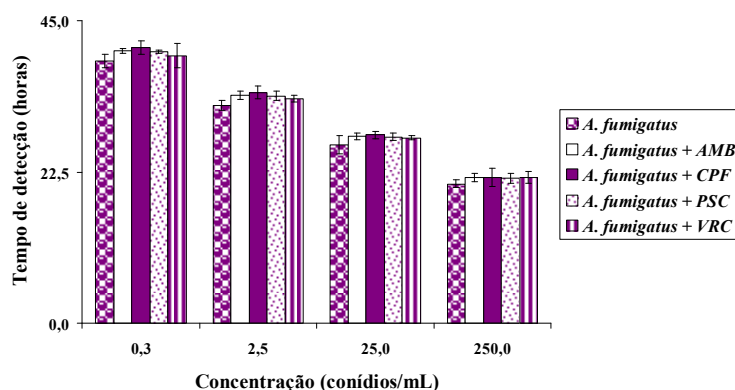


Gráfico 8. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com anfotericina B (AMB), caspofungina (CPF), posaconazole (PSC) e voriconazole (VRC), pelo equipamento BACTEC™ 9240

Relativamente aos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic, nenhum crescimento foi detectado até ao fim do período de incubação, na presença concomitante de AMB e PSC. No entanto, o crescimento de *A. fumigatus* foi detectado nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic contendo concomitantemente CPF e VRC, significativamente mais tarde ($P < 0,001$) relativamente aos mesmos frascos de cultura sem antifúngicos (Gráficos 9 e 10). Assim, os tempos de detecção de crescimento de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F variaram entre $49,9 \pm 1,1$ e $145,7 \pm 1,6$ h na presença de CPF e entre $74,9 \pm 1,9$ e $211,6 \pm 1,9$ h na presença de VRC. Nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic aos quais foi adicionado concomitantemente CPF e VRC, o *A. fumigatus* foi detectado, respectivamente, entre as $90,8 \pm 1,0$ e $167,7 \pm 0,1$ h e entre $95,0 \pm 1,6$ e $226,6 \pm 1,0$ h.

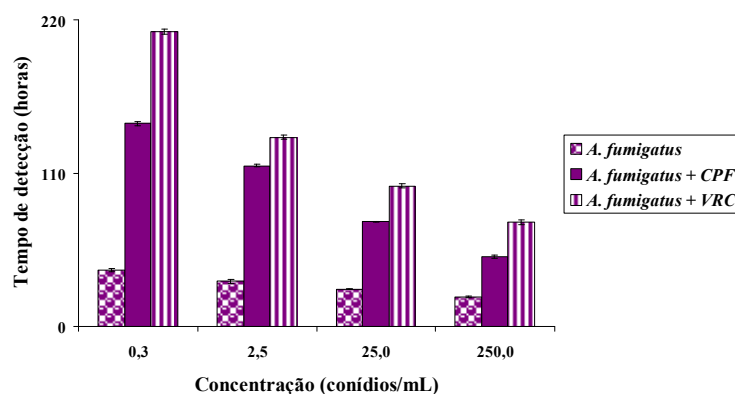


Gráfico 9. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com anfotericina B (AMB), caspofungina (CPF), posaconazole (PSC) e voriconazole (VRC), pelo equipamento BACTEC™ 9240

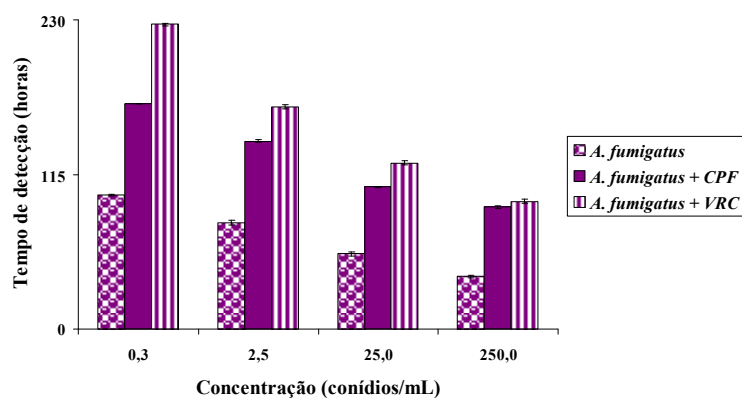


Gráfico 10. Detecção de crescimento nos frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados concomitantemente com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e com anfotericina B (AMB), caspofungina (CPF), posaconazole (PSC) e voriconazole (VRC), pelo equipamento BACTEC™ 9000 MB

4.4 Subculturas dos frascos de cultura BACTEC™

Após repicar para meio de cultura sólido os frascos de cultura BACTEC™ presuntivamente positivos inoculados com concentrações finais de 2,5 conídios/mL de *A. fumigatus*, utilizando-se o procedimento de rotina, não se verificou qualquer crescimento

nas subculturas, após 5 dias de incubação; verificaram-se recuperações inconsistentes de *A. fumigatus* nas subculturas dos frascos de cultura inoculados com concentrações finais de 25 conídios/mL; *A. fumigatus* foi detectado às 24-48 h, em todas as subculturas dos frascos de cultura inoculados com concentrações finais de 250 conídios/mL. Quando se recorreu à recolha com uma seringa de insulina, após vigorosa agitação dos frascos de cultura e à sementeira de uma alíquota de 100 µL, *A. fumigatus* foi isolado às 24-48 h, em todas as subculturas dos frascos de cultura inoculados inicialmente com concentrações finais superiores a 0,3 conídios/mL.

O crescimento macroscópico de *A. fumigatus* no meio líquido dos frascos de cultura BACTEC™ pode ser facilmente apreciado pela formação de aglomerados semelhantes a “bolas fúngicas”, suspensas nos meios em que não houve inoculação de sangue (Figura 8).



Figura 8. Crescimento macroscópico de *A. fumigatus* no meio líquido dum frasco de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F

Os resultados obtidos com as subculturas dos frascos de cultura BACTEC™ contendo sangue humano foram semelhantes aos acima descritos para as subculturas dos frascos de cultura inoculados apenas com as suspensões de conídios de *A. fumigatus*, não sendo contudo perceptível a formação de aglomerados fúngicos, devido à opacidade do meio.

A partir dos frascos de cultura inoculados concomitantemente com bactérias e *A. fumigatus*, isolaram-se bactérias (*S. aureus* e *E. coli*) após 24-48 h nas repicagens dos

frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Myco/F Lytic presuntivamente positivos, inoculados inicialmente com concentrações finais superiores a 0,3 conídios/mL de *A. fumigatus*. Recorrendo ao novo método de repicagem, o *A. fumigatus* apenas foi isolado simultaneamente nas subculturas dos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Myco/F Lytic inoculados com bactérias e com concentrações finais superiores a 25 conídios/mL de *A. fumigatus*. Todas as subculturas dos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F presuntivamente positivos, inicialmente inoculados com concentrações finais superiores a 0,3 conídios/mL de *A. fumigatus*, apresentaram crescimento de *A. fumigatus* e nenhum crescimento bacteriano. *C. albicans* foi isolada após 24-48 h na repicagem dos frascos de cultura presuntivamente positivos inoculados com concentrações finais superiores a 0,3 conídios/mL de *A. fumigatus*. O *A. fumigatus* foi isolado simultaneamente nas subculturas de todos os frascos de cultura inoculados concomitantemente com concentrações finais superiores a 25 conídios/mL de *A. fumigatus*, recorrendo ao novo método de repicagem.

A recuperação de *A. fumigatus* foi semelhante nos meios gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro e gelose Sabouraud gentamicina cloranfenicol.

5 Discussão

5.1 Detecção de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™

No decurso da última década, os sistemas automatizados de detecção de microrganismos responsáveis por bacteremia ou fungemia e a composição dos meios de cultura melhoraram consideravelmente em termos de sensibilidade e rapidez e simplificaram de forma significativa os procedimentos microbiológicos. Neste contexto, as hemoculturas passaram a ser um método diagnóstico de primeira linha, frequentemente solicitado, sendo um dos mais importantes em caso de suspeita de septicemia. Assim, sistemas automatizados, nos quais a amostra é inoculada directamente, tornaram-se hoje bastante apetecíveis para um laboratório de microbiologia, possibilitando a recuperação de microrganismos a partir de amostras de sangue (Fuller *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004). No entanto, o diagnóstico definitivo de doença fúngica invasiva (DFI) permanece ainda hoje difícil de estabelecer e em especial na fase inicial de desenvolvimento da infecção, em que o estabelecimento de uma estratégia terapêutica adequada poderia melhorar significativamente o prognóstico desses doentes (Chamilos & Kontoyiannis, 2006; Walsh *et al.*, 2008). A recuperação de fungos filamentosos, muito particularmente das espécies do género *Aspergillus*, a partir de amostras de sangue é ainda hoje bastante difícil (Tarrand *et al.*, 2003; Alexander & Pfaller, 2006).

Neste estudo, os equipamentos BACTEC™ 9240 e BACTEC™ 9000 MB demonstraram uma boa sensibilidade e rapidez para a detecção de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic, quando inoculados com concentrações finais superiores a 0,3 conídios/mL. Os tempos de detecção de crescimento de *A. fumigatus* variaram entre 21-100 h, em função do meio de cultura BACTEC™ utilizado, obtendo-se resultados mais rápidos com os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F (21-40 h), e em função do tamanho de inóculo, sendo que valores superiores de inóculo resultaram numa detecção mais rápida. Estes últimos resultados foram semelhantes aos obtidos por George *et al.* (2005) com um modelo simulado de candidemia. Naquele estudo, verificou-se que o tamanho do inóculo afectava a detecção de crescimento de *Candida* spp. nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, assim como o tempo de detecção pelo equipamento BACTEC™ 9240; o tempo de detecção de crescimento de *Candida* spp. era mais rápido com valores maiores de inóculo (George *et al.*, 2005).

Alguns estudos prévios compararam a recuperação e o tempo de detecção de bactérias, micobactérias e fungos pelos equipamentos BACTEC™ 9240, BACTEC™ 9000 MB e outros sistemas automatizados, recorrendo a diversos meios de cultura padronizados; porém, nenhum desses estudos envolvia *A. fumigatus* ou qualquer outra espécie do género *Aspergillus* (Archibald *et al.*, 2000; Fuller *et al.*, 2001; Vetter *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004). No nosso estudo, com o equipamento BACTEC™ 9240 obtiveram-se tempos semelhantes de detecção de crescimento de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F. Contudo, Meyer *et al.* (2004) relataram que, com o mesmo equipamento, os frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F providenciavam uma detecção mais sensível e mais rápida de vários fungos (que não *A. fumigatus*) a partir de amostras de sangue, em particular de leveduras, que os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F. O nosso estudo demonstrou ainda que os frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F, comparativamente com os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, apresentavam uma considerável vantagem em relação aos outros frascos de cultura ensaiados, na presença concomitante de bactérias, tal como descrito por Meyer *et al.* (2004) no caso de presença concomitante de leveduras com bactérias. De facto, o meio dos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F contem os

antimicrobianos cloranfenicol e tobramicina que restringem o crescimento bacteriano e saponina que é um potente indutor de lise dos glóbulos rubros, com subsequente libertação de fungos fagocitados. Vetter *et al.* (2001) relataram que os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F permitiam a recuperação de um maior número de patogénios potenciais, tais como bactérias, micobactérias e leveduras, a partir de amostras de sangue em comparação com os frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic, utilizando o equipamento BACTEC™ 9240. O nosso estudo confirmou que os frascos de cultura BACTEC™ Myco/F Lytic, contendo um meio de cultura não selectivo, permitem garantir a recuperação de fungos filamentosos, leveduras e bactérias; porém, não apresentam qualquer vantagem na recuperação de *A. fumigatus* em relação aos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F e BACTEC™ Mycosis-IC/F.

Os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F inoculados com suspensões de conídios de *A. fumigatus* e aos quais foram adicionados os antifúngicos AMB, CPF, PSC e VRC, mostraram ser consideravelmente mais vantajosos em relação aos frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F e BACTEC™ Myco/F Lytic ensaiados em idênticas condições. Este facto tem bastante relevância uma vez que um grande número de doentes com factores de risco para aspergilose invasiva (AI) pode estar sob um tratamento antifúngico empírico ou profiláctico no momento em que são efectuadas as hemoculturas; tal facto pode prejudicar significativamente a recuperação e detecção de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™ e, deste modo, o diagnóstico de AI nesses doentes. A presença de resinas adsorventes e de resinas de troca catiónica, nos frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F, bloqueia a actividade dos antifúngicos ensaiados, da mesma forma que foi descrita a neutralização da actividade de outros antimicrobianos (Flayhart *et al.*, 2007). As resinas poliméricas adsorventes fixam as porções hidrofóbicas da maioria dos antimicrobianos, enquanto as resinas de troca catiónica, fortemente ácidas, ligam os antimicrobianos carregados positivamente.

5.2 Subculturas dos frascos de cultura BACTEC™

Apesar dos equipamentos BACTEC™ 9240 e BACTEC™ 9000 MB detectarem o crescimento de *A. fumigatus* em todos os frascos de cultura BACTEC™ ensaiados, inoculados com concentrações finais superiores a 0,3 conídios/mL, este fungo filamentososo não foi recuperado em todas as subculturas dos frascos de cultura BACTEC™ presuntivamente positivos, quando se recorreu para a repicagem dos mesmos ao método de rotina, com uma agulha (“sterile airway needle/subculture unit”) e sementeira de 1-2 gotas (cerca de 25 µL) da suspensão contida em cada frasco de cultura. Este facto pode ser interpretado erradamente como um resultado falso-positivo. Curiosamente, outros estudos prévios não levantaram o problema de resultados falso-positivos, mas sim de resultados falso-negativos com modelos simulados de candidemia, em que *Candida* spp. foram isoladas nas subculturas de frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F que tinham sido sinalizados como negativos pelo equipamento BACTEC™ 9240; porém nenhuma explicação foi adiantada (Horvath *et al.*; 2003; Horvath *et al.*; 2004; George *et al.*; 2005).

No nosso estudo, ensaiamos um novo método de repicagem, em que após uma vigorosa agitação do frasco de cultura BACTEC™ foi utilizada uma seringa de insulina para retirar uma alíquota maior (100 µL) da suspensão contida no mesmo (procedimento semelhante ao usado na rotina para as hemoculturas de micobactérias). Verificamos uma melhoria significativa na detecção de *A. fumigatus* nas subculturas dos frascos de cultura presuntivamente positivos, recuperando-se consistentemente *A. fumigatus* a partir de um inóculo inicial de 0,3 conídios/mL.

O meio gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro, incubado em atmosfera com 5-10% de CO₂ durante 48 horas a 35°C, demonstrou uma elevada sensibilidade na recuperação de *A. fumigatus*, não tendo sido reconhecida nenhuma vantagem relativa ao uso de meio gelose Sabouraud gentamicina cloranfenicol, incubado durante 5 dias a 25°C. De facto, o *A. fumigatus* é pouco exigente a nível nutricional, mostrando um crescimento rápido nos mais diversos meios de cultura frequentemente utilizados nos laboratórios de microbiologia, é termotolerante, apresentando um crescimento óptimo para temperaturas situadas entre 37°C e 45°C, e, apesar de ser um aeróbio obrigatório, a germinação dos seus

conídios pode ser favorecida na presença de uma baixa tensão de O₂. A sementeira de amostras clínicas contendo *Aspergillus* em condições que simulam o ambiente fisiológico dos tecidos (35°C, numa atmosfera com 6% de O₂ e 10% de CO₂) pareceram melhorar de forma significativa o crescimento e a recuperação de *Aspergillus* relativamente à sua incubação a 25°C em atmosfera de aerobiose (Tarrand *et al.*, 2005).

Relativamente às subculturas dos frascos de cultura BACTEC™ inoculados concomitantemente com *A. fumigatus* e com bactérias ou com leveduras, apenas nas efectuadas a partir dos frascos de cultura inoculados inicialmente com concentrações finais superiores a 25 conídios/mL e utilizando o novo método de repicagem proposto, foi possível isolar o *A. fumigatus* e outros microrganismos simultaneamente. A ausência de detecção de *A. fumigatus* nos frascos de cultura inoculados com concentrações finais inferiores a 25 conídios/mL pode ser devida à inibição do crescimento de *A. fumigatus* pelo crescimento mais rápido bacteriano ou de *C. albicans* ou ainda pela eventual produção de substâncias antifúngicas, nomeadamente pelas bactérias, que possam interferir com o crescimento de *A. fumigatus* e, desta forma limitar a sua detecção. Neste contexto, e para situações clínicas muito particulares, a ocorrência de infecções polimicrobianas pode tornar-se problemática relativamente à recuperação e detecção de *A. fumigatus*. Nestes casos, os frascos de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F podem melhorar significativamente a sensibilidade da detecção de *A. fumigatus*, revelando-se bastante vantajosa a inoculação simultânea de um frasco de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F com um frasco de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F.

6 Conclusão

Os sistemas automatizados BACTEC™ 9240 e BACTEC™ 9000 MB garantem uma detecção rápida e sensível de *A. fumigatus* nos frascos de cultura BACTEC™ mais frequentemente utilizados, nomeadamente o BACTEC™ Plus Aerobic/F, o BACTEC™ Mycosis-IC/F e o BACTEC™ Myco/F Lytic, particularmente para inóculos de *A. fumigatus* superiores a 0,3 conídios/mL.

No entanto, a subsequente repicagem dos frascos de cultura BACTEC™ para os meios de cultura sólidos usando o método de rotina - uma agulha (“sterile airway needle/subculture unit”) e sementeira de 1-2 gotas (cerca de 25 µL) da suspensão contida em cada frasco de cultura - resulta em subculturas negativas. Este facto pode levar a uma interpretação errónea de resultados, tomando-os como falso-positivos. O novo método de repicagem proposto, em que os frascos de cultura são agitados vigorosamente antes de ser retirada uma alíquota maior (100 µL) com uma seringa de insulina, pode ultrapassar essa limitação.

Os frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F parecem ser os mais recomendáveis para a detecção de *A. fumigatus*, particularmente em doentes submetidos a tratamento antifúngico no momento da colheita das amostras. Nos casos muito particulares de forte suspeita de infecção polimicrobiana, a inoculação de um frasco de cultura BACTEC™ Mycosis-IC/F simultaneamente com um frasco de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F pode ser aconselhável.

Em última análise, o trabalho desenvolvido permite concluir que, pese embora nas amostras clínicas em caso de aspergilose invasiva o inóculo não seja de conídios, a

invariável negatividade das hemoculturas para *Aspergillus* se deve a um falso negativo com origem no processo de repicagem e não a uma incapacidade de o *Aspergillus* crescer na presença de sangue, tal como foi demonstrado.

7 Perspectivas Futuras

O aumento crescente do número de doentes imunocomprometidos, assim como de doentes críticos admitidos em Unidades de Cuidados Intensivos e a incapacidade de desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos, sensíveis e específicos contribuirão muito provavelmente para um aumento dos casos de aspergilose invasiva (AI) nos próximos anos e a inaceitável alta mortalidade. O recurso generalizado a terapêutica antifúngica empírica ou profiláctica, que pode levar ao surgimento de estirpes resistentes, tornará mandatário a realização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos a fungos do género *Aspergillus*. Apesar do recente enfoque em métodos rápidos e sensíveis de diagnóstico de AI, como o galactomanano, o (1→3)-β-D-glucano ou a detecção pela reacção da polimerase em cadeia, o isolamento em cultura, para além de demonstrar inequivocamente a viabilidade do agente infeccioso, é o único método que possibilitará a ulterior avaliação do padrão de susceptibilidade aos antifúngicos; neste contexto, as hemoculturas representam um método de primeira linha. Será pois de maior relevância validar o novo método de processamento de hemoculturas. Importa também reavaliar a sensibilidade, especificidade e rapidez diagnóstica das hemoculturas comparativamente com os outros métodos disponíveis, não apenas relativamente a *A. fumigatus*, mas também a espécies como *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus* e *A. niger*, que tudo aponta como agentes emergentes de doenças fúngicas invasivas.

Referências Bibliográficas

- **Abarca ML.** [Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis]. Rev Iberoam Micol 2000; **17**:S79-84.
- **Alexander BD, Pfaller MA.** Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. Clin Infect Dis 2006; **43**:S15-27.
- **Alhambra A, Cuétara MS, Ortiz MC, Moreno JM, del Palacio A, Pontón J, del Palacio A.** False positive galactomannan results in adult hematological patients treated with piperacillin-tazobactam. Rev Iberoam Micol 2007; **24**:106-12.
- **Anaissie EJ.** Trial design for mold-active agents: time to break the mold – aspergillosis in neutropenic adults. Clin Infect Dis 2007; **44**:1298-306.
- **Antachopoulos C, Meletiadis J, Sein T, Roilides E, Walsh TJ.** Concentration-dependent effects of caspofungin on the metabolic activity of *Aspergillus* species. Antimicrob Agents Chemother 2007; **51**:881-7.
- **Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC.** Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. Mycopathologia 2007; **163**:191-202.

- **Araujo R.** Na génese da infecção sistémica por *Aspergillus fumigatus*. Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto 2007.
- **Araujo R, Rodrigues AG.** Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. J Clin Microbiol 2004; **42**:4335-7.
- **Araujo R, Rodrigues AG, Pina-Vaz C.** A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. J Med Microbiol 2004; **53**:783-6.
- **Archibald LK, McDonald LC, Addison RM, McKnight C, Byrne T, Dobbie H, Nwanyanwu O, Kazembe P, Reller LB, Jarvis WR.** Comparison of BACTEC MYCO/F LYTIC and WAMPOLE ISOLATOR 10 (lysis-centrifugation) systems for detection of bacteremia, mycobacteremia, and fungemia in a developing country. J Clin Microbiol 2000; **38**:2994-7.
- **Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, Kaneko M, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M.** False-positive *Aspergillus* galactomannan antigenaemia after haematopoietic stem cell transplantation. J Antimicrob Chemother 2008; **61**:411-6.
- **Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.** Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis 2002; **34**:7-14.

- **Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, Rousselot P, Raffoux E, Menotti J, Derouin F, Ribaud P, Sulahian A.** Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with β -lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2006; **44**:389-94.
- **Azanza JR, García-Quetglas E, Sádaba B.** [Pharmacology of azoles]. *Rev Iberoam Micol* 2007; **24**:223-7.
- **Bajjoka IE, Bailey EM, Vazquez JA, Abouljoud MS.** Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis infection in liver transplant recipients: report of two patients. *Pharmacotherapy* 1999; **19**:118-23.
- **Balajee SA, Marr KA.** Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2002; **40**:2741-5.
- **Barnes PD, Marr KA.** Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am* 2006; **20**:545-61.
- **Bouza E, Sousa D, Rodríguez-Créixems M, Lechuz JG, Muñoz P.** Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *J Clin Microbiol* 2007; **45**:2765-9.
- **Chamilos G, Kontoyiannis DP.** Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2006; **44**:S163-72.
- **Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, Safdar A, Raad II, Kontoyiannis DP.** Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica* 2006; **91**:986-9.

- **Clinical Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, Second Edition. M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute 2008, Wayne, USA.
- **Cummings JR, Jamison GR, Boudreaux JW, Howles MJ, Walsh TJ, Hayden RT.** Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59**:113-5.
- **De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group.** Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; **46**:1813-21.
- **Del Bono V, Mikulska M, Viscoli C.** Invasive aspergillosis: diagnosis, prophylaxis and treatment. *Curr Opin Hematol* 2008; **15**:586-93.
- **Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, Kelly SL.** Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:1364-8.
- **Donnelly JP.** Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. *Clin Infect Dis* 2006; **42**:487-9.

- **El Saleeby CM, Allison KJ, Knapp KM, Walsh TJ, Hayden RT.** Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving Aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:3560-3.
- **Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, Messer S, Rinaldi M, Fothergill A, Gibbs DL, Wang A.** Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:1811-20.
- **Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC.** Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol* 2007; **45**:816-21.
- **Fréalle E, Decrucq K, Botterel F, Bouchindhomme B, Camus D, Dei-Cas E, Costa JM, Yakoub-Agha I, Bretagne S, Delhaes L.** Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage in haematology patients: influence of bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCR performance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; doi:10.1007/s10096-008-0616-1.
- **Fuller DD, Davis TE Jr, Denys GA, York MK.** Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic medium for recovery of mycobacteria, fungi, and bacteria from Blood. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:2933-6.
- **George BJ, Horvath LL, Hospenthal DR.** Effect of inoculum size on detection of *Candida* growth by the BACTEC 9240 automated blood culture system using aerobic and anaerobic media. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:433-5.
- **Giacchino M, Chiapello N, Bezzio S, Fagioli F, Saracco P, Alfarano A, Martini V, Cimino G, Martino P, Girmenia C.** *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked

immunosorbent assay cross-reactivity caused by invasive *Geotrichum capitatum*. J Clin Microbiol 2006; **44**:3432-4.

- **Gil L, Kozłowska-Skrzypczak M, Mol A, Poplawski D, Styczynski J, Komarnicki M.** Increased risk for invasive aspergillosis in patients with lymphoproliferative diseases after autologous hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 2008; doi:10.1038/bmt.2008.303.

- **Hage CA, Reynolds JM, Durkin M, Wheat LJ, Knox KS.** Plasmalyte as a cause of false-positive results for *Aspergillus* galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol 2007; **45**:676-7.

- **Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, Villard O, Liu KL, Natarajan-Amé S, Lutz P, Dufour P, Bergerat JP, Candolfi E.** *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. J Clin Oncol 2002; **20**:1898-906.

- **Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities.** NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; **29**:996-1011.

- **Holding KJ, Dworkin MS, Wan PC, Hanson DL, Klevens RM, Jones JL, Sullivan PS.** Aspergillosis among people infected with human immunodeficiency virus: incidence and survival. Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Project. Clin Infect Dis 2000; **31**:1253-7.

- **Hope WW, Walsh TJ, Denning DW.** The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. Med Mycol 2005a; **43**:S207-38.

- **Hope WW, Walsh TJ, Denning DW.** Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005b; **5**:609-22.
- **Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR.** Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:115-8.
- **Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP.** Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with plus aerobic/F and anaerobic/F blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:4714-7.
- **Hughes JG, Vetter EA, Patel R, Schleck CD, Harmsen S, Turgeant LT, Cockerill FR 3rd.** Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:4468-71.
- **Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, Kanda Y, Nakao A, Kitamura T, Fujita T, Yamamoto K, Mimura T.** Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)- β -D-glucan level. *Kidney Int* 2001; **60**:319-23.
- **Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, Hishida A.** Elevation of blood (1→3)- β -D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* 2001; **89**:15-9.
- **Khan ZU, Ahmad S, Theyyathel AM.** Detection of *Aspergillus fumigatus*-specific DNA, (1→3)- β -D-glucan and galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage specimens of experimentally infected rats. *Mycoses* 2008; **51**:129-35.
- **Khot PD, Ko DL, Hackman RC, Fredricks DN.** Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infect Dis* 2008; doi:10.1186/1471-2334-8-73.

- **Klich MA.** Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1st edition: Utercht, The Netherlands 2002.
- **Kontoyiannis DP, Bodey GP.** Invasive aspergillosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; **21**:161-72.
- **Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, Bodey GP, Storey R, Raad II.** Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. Clin Infect Dis 2000; **31**:188-9.
- **Kwak EJ, Husain S, Obman A, Meinke L, Stout J, Kusne S, Wagener MM, Singh N.** Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. J Clin Microbiol 2004; **42**:435-8.
- **Lai CC, Hsu HL, Lee LN, Hsueh PR.** Assessment of Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis. J Microbiol Immunol Infect 2007; **40**:148-53.
- **Latgé JP.** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; **12**:310-50.
- **Lewis RE, Kontoyiannis DP.** Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients. Med Mycol 2008; **25**:1-11.
- **Libanore M, Prini E, Mazzetti M, Barchi E, Rauseo E, Gritti FM, Bonazzi L, Ghinelli F.** Invasive Aspergillosis in Italian AIDS patients. Infection 2002; **30**:341-5.
- **Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najvar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Dietz K, Bialek R, Einsele H.** Polymerase chain reaction detection of

aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis. J Infect Dis 2002; **185**:1203-6.

- **Maertens JA, Klont R, Masson C, Theunissen K, Meersseman W, Lagrou K, Heinen C, Crépin B, Van Eldere J, Tabouret M, Donnelly JP, Verweij PE.** Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. Clin Infect Dis 2007a; **44**:1329-36.

- **Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Van Eldere J.** Advances in the serological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections in patients with haematological disorders. Mycoses 2007b; **50**:2-17.

- **Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, Wilmer A, Verhaegen J, Boogaerts M, Van Eldere J.** Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. Clin Infect Dis 2005; **41**:1242-50.

- **Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, Eldere JV.** Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. Br J Haematol 2004; **126**:852-60.

- **Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M.** Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. J Infect Dis 2002; **186**:1297-306.

- **Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W.** Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. Clin Infect Dis 2005; **40**:1762-9.

- **Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L.** Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002; **100**:4358-66.
- **Marty FM, Koo S.** Role of (1→3)-β-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2008; **13**:1-8.
- **Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, Kubiak DW, Finkelman MA, Baden LR.** Reactivity of (1→3)-β-D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**:3450-3.
- **McClenny N.** Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol* 2005; **43**:S125-8.
- **Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E.** Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2007; **45**:205-16.
- **Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Donnelly PJ, Verweij PE; EUROFUNG Network.** Comparison of spectrophotometric and visual readings of NCCLS method and evaluation of a colorimetric method based on reduction of a soluble tetrazolium salt, 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide], for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:4256-63.
- **Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJ, Verweij PE.** In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-β-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2006a; **44**:1711-8.

- **Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweij PE.** (1→3)-β-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* 2006b; **354**:2834-5.
- **Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJ, Verweij PE.** Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:3925-31.
- **Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE.** Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**:349-57.
- **Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E.** Comparison of Mycosis IC/F and Plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the Bactec 9240 system. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:773-7.
- **Murashige N, Kami M, Kishi Y, Fujisaki G, Tanosaki R.** False-positive results of *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assays for a patient with gastrointestinal graft-versus-host disease taking a nutrient containing soybean protein. *Clin Infect Dis* 2005; **40**:333-4.
- **Nagasawa K, Yano T, Kitabayashi G, Morimoto H, Yamada Y, Ohata A, Usami M, Horiuchi T.** Experimental proof of contamination of blood components by (1→3)-β-D-glucan caused by filtration with cellulose filters in the manufacturing process. *J Artif Organs* 2003; **6**:49-54.
- **Nakao A, Yasui M, Kawagoe T, Tamura H, Tanaka S, Takagi H.** False-positive endotoxemia derives from gauze glucan after hepatectomy for hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 1997; **44**:1413-8.

- **Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, Moghaddam A, Natarajan-Amé S, Fohrer C, Lioure B, Bilger K, Lutun P, Marcellin L, Launoy A, Freys G, Bergerat JP, Herbrecht R.** Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2008; **47**:1176-84.
- **Nosari A, Anghileri M, Carrafiello G, Guffanti C, Marbello L, Montillo M, Muti G, Ribera S, Vanzulli A, Nichelatti M, Morra E.** Utility of percutaneous lung biopsy for diagnosing filamentous fungal infections in hematologic malignancies. *Haematologica* 2003; **88**:1405-9.
- **Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L.** β -D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; **39**:199-205.
- **Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N.** Reappraisal of the serum (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections – a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis* 2008; **46**:1864-70.
- **Ogawa M, Hori H, Niiguchi S, Azuma E, Komada Y.** False-positive plasma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan test following immunoglobulin product replacement in an adult bone marrow recipient. *Int J Hematol* 2004; **80**:97-8.
- **Ozkutuk A, Ergon C, Metin DY, Yucesoy M, Polat SH.** Comparison of disk diffusion, E-test and broth microdilution test in determination of susceptibility of *Aspergillus* species to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. *J Chemother* 2008; **20**:87-92.
- **Pasqualotto AC, Denning DW.** New and emerging treatments for fungal infections. *Antimicrob Chemother* 2008; **61**:i19-30.

- **Paterson RR.** Internal amplification controls have not been employed in fungal PCR hence potential false negative results. *J Appl Microbiol* 2007; **102**:1-10.
- **Pazos C, Pontón J, Del Palacio A.** Contribution of (1→3)-β-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:299-305.
- **Penack O, Rempf P, Graf B, Blau IW, Thiel E.** *Aspergillus* galactomannan testing in patients with long-term neutropenia: implications for clinical management. *Ann Oncol* 2008; **19**:984-9.
- **Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA; Mycoses Study Group.** The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; **33**:1824-33.
- **Perlin DS, Zhao Y.** Molecular diagnostic platforms for detecting *Aspergillus*. *Med Mycol* 2008; doi:10.1080/13693780802126583.
- **Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A.** Contribution of the (1→3)-β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2008; **46**:1009-13.
- **Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N.** Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; **42**:1417-27.
- **Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL.** Evaluation of a (1→3)-β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:5957-62.

- **Qiao J, Liu W, Li R.** Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2008; **49**:157-63.
- **Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J.** Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia *Aspergillus* test for galactomannan detection in serum. J Clin Microbiol 2007; **45**:3141-2.
- **Rhodes JC.** *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. Med Mycol 2006; **44**:S77-81.
- **Sabol K, Gumbo T.** Anidulafungin in the treatment of invasive fungal infections. Ther Clin Risk Manag 2008; **4**:71-8.
- **Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B.** Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. J Clin Microbiol 2007; **45**:906-14.
- **Segal BH, Walsh TJ.** Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. Am J Respir Crit Care Med 2006; **173**:707-17.
- **Senn L, Robinson JO, Schmidt S, Knaup M, Asahi N, Satomura S, Matsuura S, Duvoisin B, Bille J, Calandra T, Marchetti O.** 1,3- β -D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. Clin Infect Dis 2008; **46**:878-85.
- **Simoneau E, Kelly M, Labbe AC, Roy J, Laverdière M.** What is the clinical significance of positive blood cultures with *Aspergillus* sp in hematopoietic stem cell transplant recipients? A 23 year experience. Bone Marrow Transplant 2005; **35**:303-6.

- **Singh N, Paterson DL.** *Aspergillus* infections in transplant recipients. Clin Microbiol Rev 2005; **18**:44-69.
- **Sorlin P, Mansoor I, Dagyarani C, Struelens MJ.** Comparison of resin-containing BACTEC Plus Aerobic/F medium with conventional methods for culture of normally sterile body fluids. J Med Microbiol 2000; **49**:787-91.
- **Soubani AO, Khanchandani G, Ahmed HP.** Clinical significance of lower respiratory tract *Aspergillus* culture in elderly hospitalized patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; **23**:491-4.
- **Spiess B, Seifarth W, Hummel M, Frank O, Fabarius A, Zheng C, Mörz H, Hehlmann R, Buchheidt D.** DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. J Clin Microbiol 2007; **45**:3743-53.
- **Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, Denning DW, Cramer R, Brody AS, Light M, Skov M, Maish W, Mastella G; Participants in the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference.** Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. Clin Infect Dis 2003; **37**:S225-64.
- **Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahé V, Quesne G, Poirée S, Buzyn A, Varet B, Berche P, Bougnoux ME.** Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. J Clin Microbiol 2008; **46**:3772-7.
- **Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F.** Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of

invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* 2001; **91**:311-8.

- **Tarrand JJ, Han XY, Kontoyiannis DP, May GS.** *Aspergillus* hyphae in infected tissue: evidence of physiologic adaptation and effect on culture recovery. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:382-6.
- **Tarrand JJ, Lichterfeld M, Warraich I, Luna M, Han XY, May GS, Kontoyiannis DP.** Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 2003; **119**:854-8.
- **Trof RJ, Beishuizen A, Debets-Ossenkopp YJ, Girbes AR, Groeneveld AB.** Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients. *Intensive Care Med* 2007; **33**:1694-703.
- **Tuon FF.** A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol* 2007; **24**:89-94.
- **Upton A, Gugel A, Leisenring W, Limaye A, Alexander B, Hayden R, Marr KA.** Reproducibility of low galactomannan enzyme immunoassay index values tested in multiple laboratories. *J Clin Microbiol* 2005; **43**:4796-800.
- **Usami M, Ohata A, Horiuchi T, Nagasawa K, Wakabayashi T, Tanaka S.** Positive (1→3)-β-D-glucan in blood components and release of (1→3)-β-D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. *Transfusion* 2002; **42**:1189-95.
- **Vaideeswar P, Prasad S, Deshpande JR, Pandit SP.** Invasive pulmonary aspergillosis: A study of 39 cases at autopsy. *J Postgrad Med* 2004; **50**:21-6.

- **Vale-Silva LA, Buchta V.** Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses* 2006; **49**:261-73.
- **Vetter E, Torgerson C, Feuker A, Hughes J, Harmsen S, Schleck C, Horstmeier C, Roberts G, Cockerill F 3rd.** Comparison of the BACTEC MYCO/F Lytic bottle to the isolator tube, BACTEC Plus Aerobic F/bottle, and BACTEC Anaerobic Lytic/10 bottle and comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/bottle to the isolator tube for recovery of bacteria, mycobacteria, and fungi from blood. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:4380-6.
- **Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF; Infectious Diseases Society of America.** Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; **46**:327-60.
- **Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, Walsh TJ, Knox K, Hage C.** Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2007; **14**:638-40.
- **Wiederhold NP, Najvar LK, Vallor AC, Kirkpatrick WR, Bocanegra R, Molina D, Olivo M, Graybill JR, Patterson TF.** Assessment of serum (1→3)-β-D-glucan concentration as a measure of disease burden in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:1176-8.
- **Wiederhold NP, Kontoyiannis DP, Chi J, Prince RA, Tam VH, Lewis RE.** Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. *J Infect Dis* 2004; **190**:1464-71.
- **Wilson ML, Mirrett S, Meredith FT, Weinstein MP, Scotto V, Reller LB.** Controlled clinical comparison of BACTEC plus anaerobic/F to standard anaerobic/F as

the anaerobic companion bottle to plus aerobic/F medium for culturing blood from adults. J Clin Microbiol 2001; **39**:983-9.

- **Wingard JR, Ribaud P, Schlamm HT, Herbrecht R.** Changes in causes of death over time after treatment for invasive aspergillosis. Cancer 2008; **112**:2309-12.
- **Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H.** Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. Medicine (Baltimore) 2000; **79**:155-69.
- **Woods G, Miceli MH, Graziutti ML, Zhao W, Barlogie B, Anaissie E.** Serum *Aspergillus* galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer. Cancer 2007; **110**:830-4.
- **Zandijk E, Mewis A, Magerman K, Cartuyvels R.** False-positive results by the platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. Clin Vaccine Immunol 2008; **15**:1132-3.