



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**MILTON CAMPLES JUNIOR**

---

---

**Caracterização e Identificação de Fungos Causadores  
de Infecções Nosocomiais em Pacientes Transplantados de  
Células Tronco Hematopoiéticas**

---

---

**Goiânia**

**2013**

**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e  
Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	MILTON CAMPLESI JUNIOR		
E-mail:	<a href="mailto:camplesi jr@yahoo.com.br">camplesi jr@yahoo.com.br</a>		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	BRASIL	UF: GO	CNPJ:
Título:	Caracterização e Identificação de Fungos Causadores de Infecções Nosocomiais em Pacientes Transplantados de Células Tronco Hematopoiéticas		
Palavras-chave:	<i>Aspergillus sp</i> , Pacientes Transplantados de Células Tronco Hematopoiéticas, Galactomanana		
Título em outra língua:	Characterization and Identification of Fungi Causing Nosocomial Infection in Patients Transplanted Hematopoietic Stem Cells		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Aspergillus sp</i> , Patients Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Galactomannan		
Área de concentração:	MICROBIOLOGIA		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	21/01/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás		
Orientador (a):	Profª. Drª. Maria do Rosário Rodrigues Silva		
E-mail:	<a href="mailto:rosario@iptsp.ufg.br">rosario@iptsp.ufg.br</a>		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento       SIM       NÃO<sup>1</sup>  
 Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 20 / 08 / 2013

\_\_\_\_\_  
 MILTON CAMPLESI JUNIOR

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**MILTON CAMPLESI JUNIOR**

---

---

**Caracterização e Identificação de Fungos Causadores  
de Infecções Nosocomiais em Pacientes Transplantados de  
Células Tronco Hematopoiéticas**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública, na área de Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Rosário Rodrigues Silva

**Goiânia**

**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

C197c Camplesi Júnior, Milton.  
Caracterização e identificação de fungos causadores de infecções nosocomiais em pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas [manuscrito] / Milton Camplesi Júnior. – 2013.  
78 f. : figs., tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Maria do Rosário Rodrigues Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, 2013.

Bibliografia.

1. Aspergilose pulmonar. 2. Infecção hospitalar – Paciente transplantado – Células tronco hematopoiéticas. 3. Aspergillus - Células tronco hematopoiéticas. I. Título.

CDU: 616.992: 602.9

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno: Milton Camplesi Junior**

---

**Orientadora: Profa. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva**

---

**Membros:**

1. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria do Rosário Rodrigues Silva
2. Prof. Dr. Xisto Sena Passos
3. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosália Santos Amorim Jesuino
4. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carolina Rodrigues Costa
5. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes

---

**Data: 21 / 01 / 2013**

---

*À minha querida mãe **Ruth**, pelo carinho durante os anos em que vivemos juntos, saudades. Ao meu pai **Milton** pelo apoio.*

*À minha esposa **Daniela**, pelo incentivo e força nos momentos mais difíceis, a minha profunda estima e admiração.*

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus por estar sempre presente e por ter me guiado em mais essa conquista.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria do Rosário Rodrigues Silva, pela paciência, conhecimento e dedicação ao ensinar a arte de orientar. Pelo respeito adquirido como professora, orientadora e pessoa ao longo desses anos em que tive o privilégio de estar ao seu lado, minha profunda estima e admiração.

Ao Prof. Dr. Xisto Sena Passos, pelas contribuições na banca de qualificação, pela indicação na realização deste projeto e pela amizade adquirida ao longo desses anos.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carolina Rodrigues Costa, pela prontidão em participar desta banca, pela amizade e respeito adquirido ao longo do desenvolvimento deste estudo.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes, pelas contribuições e apoio no desenvolvimento deste estudo.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosália Santos Amorim Jesuino, por ter aceitado participar da banca.

Ao Dr. Adriano de Moraes Arantes, pelo apoio e participação na realização deste projeto representando o Hospital Araujo Jorge e por ter participado da banca de qualificação.

Aos meus colegas do Laboratório de Micologia: Hildene Meneses e Silva, Murilo dos Santos, Fábio Silvestre de Ataíde, Flávio Ezzedinne El Assal, Maysa Paula da Costa, Fernando Yano, Núbia Pereira Pontes, Thaísa Cristina da Silva, Franciele Pereira de Carvalho, Cícero Júnior, Aline Almeida Souza, Carolina Martins Tremea, Tayse Silva dos Santos, Lais Carneiro Naziasene Lima, Camila Pereira da Silva, Thaisa Cristina Silva e Pedro Henrique Dias Botelho, pelos bons momentos de descontração e trocas de experiência que me proporcionaram a finalização desse trabalho.

Ao Hospital Araújo Jorge pela colaboração na realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
SUMÁRIO	II
TABELAS	I
FIGURAS	II
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Infecções Fúngicas em TCTH	1
1.2 <i>Aspergillus</i> spp.	2
1.3 Aspergilose Invasiva	2
1.4 Fatores que Influenciam a Infecção por <i>Aspergillus</i>	4
1.5 Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	6
1.6 Infecções causadas por <i>Candida</i> spp.	7
1.7 Terapia para Infecções Fúngicas	8
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Amostras Clínicas	14
4.2 Isolamento e identificação dos fungos	14
4.3 Diagnóstico por GM	15
4.4 Suscetibilidade <i>in vitro</i>	16
4.4.1 Agentes Antifúngicos	16
4.4.2 Preparo do Inóculo	17
5 RESULTADOS	20
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	50
Anexo 1: Formulário dos Pacientes	50
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	53
Anexo 3: Consentimento da Participação da Pessoa como Sujeito da Pesquisa	56
Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Responsável Legal pelo Paciente Menor de Idade – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	58
Anexo 5: Parecer do Comitê de Ética, TCLE	62
Anexo 6: ARTIGO 1	63
Anexo 7: ARTIGO 2	73

## TABELAS

---

---

TABELA 1. Agentes antifúngicos, procedência, solventes e variações das concentrações usadas no teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> .....	17
TABELA 2. Análise das características e fatores de risco dos 117 pacientes TCTH... 20	
TABELA 3. Análise de galactomanana realizada em 392 amostras de sangue de 117 pacientes submetidos a transplantes de células tronco hematopoiéticas. ...	23
TABELA 4. Definição de aspergilose invasiva relacionada ao crescimento do fungo e detecção de GM com a sobrevida dos pacientes após o transplante de células tronco hematopoiéticas.....	24
TABELA 5. Atividade <i>in vitro</i> de quatro agentes antifúngicos para três isolados de <i>aspergillus</i> obtidos de pacientes TCTH. ....	25
TABELA 6. Suscetibilidade <i>in vitro</i> de quatro agentes antifúngicos para 16 isolados de <i>candida</i> obtidos de amostras de sangue de pacientes transplantados de células hematopoiéticas. ....	26

## FIGURAS

---

- FIGURA 1.** Esquema do procedimento para a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo.....19
- FIGURA 2.** Características microscópicas de fungos do gênero *Aspergillus* obtidas de colônias crescidas em ágar batata. A – *A. fumigatus*; B - *A. flavus* (400x).....21
- FIGURA 3.** Colônias de *Candida* crescidas em meio de chromagar. A- *C. albicans*, B- *C. parapsilosis*, C- *C. tropicalis*.....22
- FIGURA 4.** Tubo germinativo (A), Clamidoconídios (B), Assimilação de hidratos de carbono (C).....22
- FIGURA 5.** Imagem radiográfica de infiltrados pulmonares evidenciando provavelmente uma aspergilose invasiva.....24

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

AI	Aspergilose Invasiva
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CI	Candidíase Invasiva
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilssulfóxido
DO	Densidade Óptica
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GM	Galactomanana
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i>
TCTH	Transplantados de Células Tronco Hematopoiéticas
IFIs	Infecções Fúngicas Invasivas
MOPS	Morfolinopropanossulfônico
Pa	Pressão Positiva de Ar
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TMO	Transplante de Medula Óssea

## RESUMO

---

Infecções fúngicas invasivas têm emergido nas últimas duas décadas como uma das principais micoses causadoras de infecções nosocomiais, merecendo destaque aquelas causadas por espécies de *Candida* e *Aspergillus*. A aspergilose invasiva (AI) apresenta alta taxa de mortalidade e a detecção precoce de *Aspergillus* pode ser de extrema importância para o tratamento e conseqüentemente evitar a morte do paciente. O galactomanana (GM), componente protéico da parede celular de *Aspergillus* spp, pode ser detectado no soro, urina, líquido cefalorraquidiano e lavado bronqueoalveolar. A detecção de GM nos estágios iniciais da doença é considerada um marcador útil no diagnóstico precoce da doença. Neste estudo foi verificada a incidência de infecções fúngicas nos pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas (HCTH) procedentes do Hospital Araújo Jorge de Goiânia-GO. Foram analisados 117 pacientes dos quais foram catalogados dados como idade, gênero e doença de base. Destes pacientes foram coletadas 392 amostras de sangue e analisadas para detecção de GM por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e por cultivo em meio bifásico contendo *brain heart infusion* (caldo) e Sabouraud dextrose (ágar) para isolamento de fungos. Testes de suscetibilidade *in vitro* utilizando o método de microdiluição em caldo para os agentes antifúngicos: itraconazol, voriconazol, fluconazol, caspofungina e anfotericina B foram utilizados para os fungos isolados. Dentre os dados obtidos dos pacientes TCTH verificou-se que a média de idade foi de 35,7 anos e o maior número pertencia à faixa etária entre 21 e 60 anos com 52,2% pertencentes ao sexo masculino. Nestes pacientes havia 53% de receptores alogênicos e das doenças associadas os diferentes tipos de leucemias (55,5%) foram as principais responsáveis pelo transplante. Dos fungos isolados das amostras clínicas, foram identificados dois *Aspergillus fumigatus*, um *Aspergillus flavus*, um *Fusarium* sp, um *Acremonium strictum*, seis *Candida parapsilosis*, seis *Candida tropicalis* e quatro *Candida albicans*. Do total de pacientes analisados 19,6% (23/117) apresentaram duas ou mais amostras positivas para GM. Seguindo a classificação do *European Organization for Research and Treatment of Cancer*, a aspergilose invasiva foi interpretada como provada em 2,5%, definida pelo crescimento de *Aspergillus* em cultivo, 5,9% como provável pela detecção de GM no sangue e presença de infiltrados pulmonares e 2,5% como possível por alterações radiológicas sugestivas de aspergilose e GM negativo. A taxa de mortalidade para AI provada/provável foi de 60% e mostrou que a doença estava significativamente associada com o risco de morte ( $P < 0,05$ ). Os fungos filamentosos mostraram-se mais suscetíveis *in vitro* ao voriconazol, enquanto para as leveduras a maior suscetibilidade foi encontrada para caspofungina. Considerando-se que a taxa de mortalidade da AI é muito elevada e a terapia inicial pode levar ao melhor prognóstico da doença, pode-se sugerir que a detecção de GM no soro de pacientes TCTH é uma ferramenta útil para a identificação de pacientes com risco elevado de desenvolver AI, a fim de reduzir a alta mortalidade relacionada a esta condição.

## ABSTRACT

---

Invasive fungal infections have emerged in the last two decades as a major cause of nosocomial fungal infections, with emphasis on those caused by *Candida* species and *Aspergillus*. Invasive aspergillosis (IA) has a high mortality rate and early detection of *Aspergillus* is of paramount importance for the treatment and consequently prevention of patient death. The galactomannan (GM) cell wall protein component of *Aspergillus* species can be detected in serum, urine, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage. The detection of GM in the early stages of the disease is considered a useful marker for early diagnosis of the disease. The aim of this study was to determine the incidence of fungal infections in patients transplanted hematopoietic stem cells. In this study was verified the incidence of fungal infections in 117 patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), whose data such as age, gender and underlying disease were cataloged. Blood samples of these 392 patients were collected, and tested for detection of GM using ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) test and cultivated in culture medium containing biphasic brain heart infusion (broth) and Sabouraud dextrose (agar) for isolation of fungal. The fungi isolated were subjected to *in vitro* susceptibility testing using broth microdilution method for the antifungal agents: itraconazole, voriconazole, fluconazole, caspofungin and amphotericin B. Among the data obtained from HSCT patient it has been found that the mean age was 35,7 years and the largest number belonged to the age group between 21 and 60 years; 52,2% were male, 53% had received allogeneic *stem cell* transplant. Leukemias (55,5%) were the main diseases responsible for transplant. Fungal isolates from clinical samples were identified as *A. fumigatus* (02), *Aspergillus flavus* (01), *Fusarium sp* (01), *Acremonium strictum* (01), *Candida parapsilosis* (06), *Candida tropicalis* (06) and *Candida albicans* (04). Of all patients analyzed 19,6% (23/117) had two or more positive samples for GM. According to European Organization for Research and Treatment of Cancer, invasive aspergillosis was interpreted as proven in 2,5% defined by growth of *Aspergillus* in culture, 5,9% as probable for the detection of GM in blood and pulmonary infiltrates and 2,5% as possible by radiological changes suggestive of aspergillosis and negative GM. The mortality rate for AI proven/probable was 60% and showed that the disease was significantly associated with the risk of death ( $P < 0,05$ ). The filamentous fungi were more susceptible *in vitro* to voriconazole, while higher susceptibility of the yeast was found to Caspofungin. Considering that the crude mortality rate of IA is very high and the early therapy may lead to improved prognosis, we could suggest that the Platelia *Aspergillus* GM EIA in serum of patients could be useful as screening tools for identification in patients at high risk of developing IA.

## 1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

---

### 1.1 Infecções fúngicas em transplantados de células tronco hematopoiéticas (TCTH)

O transplante de medula óssea tem sido largamente usado nas últimas três décadas como terapia curativa, tanto para crianças quanto para adultos em uma variedade de doenças hematológicas. Entre estas, a aplasia medular, as hemoglobinopatias, as leucemias agudas e crônicas e os linfomas e mielomas são considerados os principais (Williamson et al. 1999). O TCTH pode ser classificado de acordo com o doador em alogênico e autólogo. No transplante tipo alogênico, as células progenitoras são infundidas de um doador compatível, sendo que estas células são imunologicamente competentes. No transplante tipo autólogo, as células infundidas são do próprio paciente carregando a imunodepressão da doença de base (Bhatti et al. 2006). Estes transplantes, tanto alogênicos quanto autólogos, representam uma parcela significativa de pacientes que podem desenvolver infecções fúngicas, principalmente durante o período de neutropenia (Nucci & Maiolino 2000, Jirí Pavlu et al. 2011). Há fortes indicações de que os transplantados alogênicos desenvolvem infecção fúngica com maior facilidade do que os autólogos, pois, os alogênicos para não apresentarem rejeição ao enxerto passam por um longo período de depressão, associado ao uso de glicocorticóides (Pagano et al. 2011).

Quando o paciente é submetido a TCTH, há diferentes fatores que são de grande importância para que os indivíduos tenham uma infecção fúngica invasiva (IFI). A duração da neutropenia, o uso de glicocorticóides, o tipo de doador, doenças subjacentes e a idade do beneficiário são considerados os principais fatores de risco para IFI (Wingard et al. 1987, McWhinney et al. 1993, Morrison et al. 1994, O'Donnell et al. 1994, Jantunen et al. 1997, Wald et al. 1997, Martino et al. 2002, Walsh et al. 2008, Jirí Pavlu et al. 2011).

Dentre as várias infecções fúngicas que acometem pacientes TCTH, merecendo destaque aquelas causadas pelos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*.

## 1.2 *Aspergillus* spp

Os membros do gênero *Aspergillus* são ubíquos, amplamente distribuídos no meio ambiente reproduzindo-se por meio de propágulos assexuais externos denominados conídios ou esporos (Del Palacio et al. 2003). As exposições a estes propágulos podem levar à colonização, a manifestações alérgicas ou a infecção invasiva dependendo de fatores adversos do hospedeiro. *A. fumigatus* é a espécie mais frequentemente associada à doença, embora outras espécies também tenham sido isoladas de pacientes com infecção invasiva (Krishnan et al. 2008, Alangaden 2011). Cerca de 185 espécies de *Aspergillus* foram identificadas e destas, 20 são documentados por causar doença humana (Krishnan et al. 2008).

As infecções por *Aspergillus* atingem diferentes regiões do hospedeiro, podendo produzir desde infecções cutâneas a sistêmicas, sendo que a aspergilose invasiva (AI) se manifesta por sintomas respiratórios, dores no tórax, respiração ofegante e é a de maior ocorrência entre os transplantados (Marr et al. 2002, Martino et al. 2009).

## 1.3 Aspergilose Invasiva

A aspergilose é primariamente adquirida pela inalação dos esporos do fungo, tendo o ar (Alonso et al. 2006) e os tecidos de algodão (Fox 2001, Kontoyiannis & Bodey 2002) como as fontes mais importantes de contaminação. A AI foi descrita pela primeira vez em 1940 após a realização de autópsias em pacientes com difícil diagnóstico (Groll et al. 1996, Kontoyiannis & Bodey 2002). Atualmente a AI é descrita como uma doença comum entre os pacientes imunocomprometidos com neutropenia prolongada ou que recebem doses elevadas de corticosteróides. Esta infecção é uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes TCTH e de órgãos sólidos. A AI tem sido relatada de 2-26% dos TCTH e de 1-15% nos receptores de transplantes de órgãos sólidos (Singh & Paterson 2005, Christopher et al. 2006). A taxa de mortalidade entre os receptores de TCTH com AI varia geralmente de 65% a 92% (Morgan et al. 2005, Singh et al. 2009) e estima-se que 9,3-16,9% de todas as mortes no primeiro ano ocorram devido a AI (Patterson 1999).

Em TCTH alogênico ou autólogo, *A. fumigatus* é predominante nas infecções principalmente quando o paciente apresenta neutropenia profunda (Bodey 1966, Latge

1999, Kontoyiannis & Bodey 2002). É conhecido que doenças de enxertos entre os hospedeiros e terapias com corticosteróides podem aumentar os riscos de AI. Como estes fatores são comuns na população de transplantados alogênicos admite-se que este tipo de transplante acarrete maior número de casos de AI (Wald et al. 1997, Marr et al. 2002, Barnes & Marr 2007, Upton et al. 2007, Alangaden 2011).

Em pacientes submetidos ao TCTH alogênico, a AI tem ocorrência bimodal. O primeiro pico de incidência ocorre durante ou logo depois do período de neutropenia (logo após o transplante). O segundo pico ocorre 100 dias após o transplante quando o paciente desenvolve reação crônica contra o enxerto do hospedeiro, necessitando do uso de corticosteróides e reduzindo assim as suas células de defesa (Van Burik et al. 2007, Mikulska et al. 2009, Martino et al. 2009). Em pacientes submetidos a transplante autólogo, a aspergilose ocorre apenas no período de neutropenia.

A AI é dificilmente diagnosticada no início da infecção, sendo sensato a observação da sintomatologia quando apresentada pelo paciente. Nas autópsias a visualização de lesões pulmonares, antes observadas por tomografias, apresentaram 90% de probabilidade de ser AI. Estima-se que aproximadamente 30% dos casos de AI não são diagnosticadas nem tratadas, sendo descobertas somente após a necropsia (Yeghen et al. 2000, Kontoyiannis & Bodey 2002).

Entre os exames utilizados para o diagnóstico da AI, a radiografia do tórax que revela infiltrações localizadas e a tomografia computadorizada são as mais sensíveis. Esta última pode mostrar típicas infiltrações nodulares mesmo em pacientes com radiografias normais. A bronqueoscopia com biópsia transbronquial fornece material para exame histopatológico e para cultivo do microrganismo (Wingard 1999).

O uso de meios de cultura padrão como o ágar Sabouraud que exibe bom crescimento das espécies de *Aspergillus* é importante para sua diferenciação e de outros fungos filamentosos que apresentam quadro clínico semelhante. Um dos problemas inerentes ao cultivo dos fungos reside no fato de resultados falsos negativos principalmente quando são usadas amostras clínicas. Neste sentido, para reduzir os resultados falsos negativos são realizadas pelo menos três culturas de cada amostra clínica. No entanto, quando as culturas são positivas, esta técnica constitui um excelente método de diagnóstico (Horvath & Dummer 1996, Munoz et al. 2003, Walsh et al. 2008).

A utilização de marcadores para a detecção precoce da AI vem se mostrando altamente promissor. Dentre as técnicas laboratoriais que podem contribuir para o

diagnóstico da AI, merece destaque a detecção de galactomanana (GM) (Yamakami et al. 1998, Loeffles et al. 2000, Verweij & Meis 2000, Kami et al. 2001, Sanguinetti et al. 2003, Walsh et al. 2008).

O GM é um componente protéico da parede celular dos fungos do gênero *Aspergillus* liberado durante a invasão de tecidos, podendo ser detectado em fluidos corporais como soro, urina, líquido cefalorraquidiano e lavado bronquealveolar (Mennink-Kersten et al. 2004, Seong et al. 2010). A detecção do galactomanano (ELISA) no soro é mais comum, sendo relatada por ter uma sensibilidade em torno de 93% e uma especificidade em torno de 95% (Maertens et al. 1999). Esta proteína pode ser detectada em estágios iniciais da doença, sendo considerada um marcador útil no diagnóstico precoce da AI (Maertens et al. 1999, Maertens et al. 2001). Pacientes que apresentam fatores de risco para AI, como longo tempo de neutropenia ou que tenham sido submetidos a transplantes, a detecção deste antígeno pode servir como um provável diagnóstico da infecção (Walsh et al. 2008).

O GM em pacientes não neutropênicos pode ter a sua sensibilidade de detecção reduzida possivelmente devido a um menor número de células fúngicas e assim menor quantidade de anticorpos anti-*Aspergillus* (Husain et al. 2004, Kwak et al. 2004). Outros fatores também interferem na detecção deste antígeno como as profilaxias antifúngicas que reduzem significativamente os níveis de circulação de GM (Marr et al. 2004, Maertens et al. 2005). Resultados falso-positivos têm sido relatados em vários contextos, inclusive em pacientes que receberam certos antibióticos ricos em  $\beta$  lactâmicos (piperacilina-tazobactam e amoxicilina-clavulanato) e em pacientes com outras micoses invasivas como peniciliose, histoplasmoze e blastomicose norte americana (Mennink-Kersten et al. 2004, Verweij & Mennink-Kersten 2006).

#### **1.4 Fatores que Influenciam a Infecção por *Aspergillus***

A estratégia de controle primário da infecção consiste em minimizar a exposição ao ar ambiente, rico em esporos do fungo dentro das unidades de saúde durante o período de alto risco (Walsh et al. 2008, Tomblyn et al. 2009, George & Alangaden 2011). As normas para a proteção do ambiente com cuidados especializados para pacientes imunocomprometidos permanecem sem regras adequadas (Ofelia et al. 2004).

As características essenciais de uma área protegida englobam (Schulster & Chinn 2003, Segal et al. 2006, Hidron et al. 2008):

1- Utilização de filtros de ar com alta eficiência de partículas (*High Efficiency Particulate Air* - HEPA) com capacidade de remoção de até 99,97% de partículas com diâmetro de 0,3 µm ou maior;

2- O fluxo de ar tem que ser direcionado de tal forma que a entrada de ar seja obrigatoriamente oposta ao de saída;

3- Pressão positiva de ar entre a sala e corredor ( $Pa \geq 12,5$ );

4- Manutenção de 12 ou mais trocas de ar por hora;

5- O quarto deve ser hermeticamente fechado.

A imunidade do indivíduo representa um fator importante na defesa de progressão da doença. Na maioria dos indivíduos hígidos, os esporos de *Aspergillus* são removidos por mecanismos de defesa inata. Pacientes imunocomprometidos como os TCTH ou de órgãos sólidos, portadores de doenças hematológicas malignas, portadores de tumores ou ainda da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) estão mais suscetíveis às infecções (Kojima et al. 2004, Vonberg & Gastmeier 2006, Pagano et al. 2011).

Alterações na imunidade mediada por células predisõem os indivíduos a infecções fúngicas. O papel dos neutrófilos no controle de infecções é fundamental. Estas células são as principais responsáveis por iniciarem e executarem a resposta inflamatória aguda. O fator mais importante na previsão do risco de infecção é a duração da neutropenia. É bem conhecido que os pacientes transplantados têm um longo tempo de neutropenia sendo que a persistência de redução de neutrófilos (em níveis  $< 0,10 \times 10^9/L$ ) por três semanas aumenta o risco de desenvolver infecção por fungos (Pagano et al. 2011).

Assim como os neutrófilos, os monócitos são componentes do sistema de defesa celular sendo que a redução destas células está correlacionada com o desenvolvimento de infecção fúngica. Os neutrófilos juntamente com monócitos/macrófagos fagocitam os conídios tentando debelar a infecção (Dvorak et al. 2005, Carol et al. 2008, Baddley et al. 2010, Pagano et al. 2011).

## 1.5 Leveduras do Gênero *Candida*

*Candida* é uma levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e de animais, colonizando a pele e mucosa do trato digestivo e urinário, bucal e vaginal. Desta forma, candidíase é na maioria das vezes de origem endógena, ocorrendo como consequência de um distúrbio imunológico do hospedeiro e dos fatores de virulência destas leveduras, que possuem habilidade de colonizar, penetrar e invadir o tecido (Brown et al. 2007, Hollenbach 2008). Atualmente existem cerca de 200 espécies de leveduras incluídas no gênero *Candida*, sendo aproximadamente 20 espécies responsáveis por infecções no homem. Dentre estas, *Candida albicans* tem sido relatado como a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Lu et al. 2004, Odds et al. 2006, Pfaller & Diekema 2007, Panizo et al. 2009). Estas leveduras são consideradas o principal grupo de fungos patógenos oportunistas, representando cerca de 8-10% das causas de infecções sanguíneas nosocomiais em UTIs (Hossain et al. 2003, Borg-von et al. 2007, Kumar et al. 2008, Karkowska-Kuleta et al. 2009, Negri et al. 2010).

Candidíase pode ocorrer como consequência do rompimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, desencadeado por alterações na barreira tecidual e na microbiota autóctone e pelo comprometimento das defesas naturais como a imunológica (Playford et al. 2008).

Mecanismos mediados por imunidade celular e humoral constituem uma eficiente proteção contra infecções por leveduras do gênero *Candida*. Os tipos de imunidades inatas e adaptativa (celular e humoral) possuem um papel importante na proteção contra a infecção por *C. albicans*. A imunidade inata através de neutrófilos e macrófagos predominam na defesa do hospedeiro contra candidemia, enquanto que a imunidade celular é ativada predominantemente por citocinas das células T CD4+ protegendo as mucosas de infecção (Fidel 2002). Pacientes com doenças graves como neoplasias, SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), portadores de doenças hematológicas e que são submetidos a tratamentos quimioterápicos apresentam uma intensa diminuição do número de neutrófilos sendo, portanto, altamente suscetíveis a infecções invasivas por *Candida* (Galván & Mariscal 2006, Richardson & Lass-Flör 2008).

Além dos fatores relacionados ao hospedeiro, *C. albicans* e espécies não *albicans* possuem importantes fatores que facilitam a sua multiplicação no hospedeiro

possibilitando a produção de infecções. Estes fatores estão relacionados principalmente com a adesão ao tecido do hospedeiro, capacidade de transformação de leveduras para hifas, variabilidade de mudança fenotípica (fenômeno *switching*), produção de exoenzimas hidrolíticas e hemolisinas, que são considerados de grande importância para a virulência do fungo (Vargas et al. 2000, Fotedar & Al-Hedaithy 2003, Negri et al. 2010).

## 1.6 Infecções causadas por *Candida* spp

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, dependendo do local da lesão, podem ser classificadas em duas formas distintas: candidíase superficial ou de mucosa e candidíase profunda ou sistêmica (Jayatilake & Samaranayake 2010).

Candidíase superficial acomete a pele e mucosas e normalmente é causada por *C. albicans* que é a espécie comensal mais comum encontrada na boca, vagina e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis (Samaranayake et al. 2006). Candidíase sistêmica ocorre preferencialmente em pacientes com a imunidade comprometida onde o microrganismo se dissemina através do sangue e pode se instalar em órgãos vitais como cérebro, coração e rins (Jayatilake & Samaranayake 2010). Em pacientes hospitalizados principalmente em unidade de terapia intensiva (UTI) vários fatores são responsáveis para aquisição de candidíase invasiva (CI) e candidemia, incluindo as terapêuticas médicas modernas que melhoram a sobrevida dos pacientes. Candidíase sistêmica está relacionada com altas taxas de mortalidade nestes indivíduos (Jayatilake 2011).

O aumento na incidência de candidemia e de infecções invasivas por espécies de *Candida* ocorre devido a um conjunto de fatores. Pacientes críticos, internados por longo período em hospitais principalmente em unidades de cuidados especiais, utilizando antibióticos e corticóides, administração de alimentação parenteral, neutropênicos e TCTH possuem vários atributos de risco para aquisição de infecção por espécies de *Candida*. Estas leveduras são responsáveis pela maioria das fungemias em pacientes TCTH e representam os fungos oportunistas mais importantes implicados em infecções nosocomiais (Barnes & Marr 2007, Staber et al. 2007, Richardson & Lass-Flörl 2008).

## 1.7 Terapia para Infecções Fúngicas

Há vários medicamentos utilizados no tratamento das infecções fúngicas e entre estes merecem destaque os derivados azólicos, os poliênicos e as equinocandinas. Os antifúngicos azólicos de administração oral ou intravenosa agem inibindo a produção do ergosterol que é o componente essencial da membrana citoplasmática fúngica (Como & Dismukes 1994, Ghannoum & Hossain 2000, Klepser et al. 2000, Silva 2005, Brown 2007). Itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol são os principais compostos triazólicos que atuam bloqueando a enzima 14- $\alpha$ -demetilase presente no citocromo P-450 da célula fúngica impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol (Vanden Bossche et al. 1994, Vanden Bossche 1997, Silva et al. 1998, Maertens 2004). Estes agentes antifúngicos apresentam-se com poucos efeitos tóxicos sendo que pode haver intolerância gastrointestinal ou ainda hepatotoxicidade.

O espectro de ação destes agentes antifúngicos é abrangente podendo ser utilizado para o tratamento de várias infecções fúngicas como paracoccidioidomicose, histoplasmoze, coccidioidomicose, aspergilose, criptococose e blastomicose norte-americana. A maioria das espécies de *Candida* mostra suscetibilidade aos azólicos (Martinez 2006).

O itraconazol intravenoso é um dos principais agentes usados contra espécies de *Aspergillus*, sendo uma alternativa à anfotericina B no tratamento de pacientes com aspergilose. O voriconazol, já disponibilizado para uso médico como V Fend<sup>®</sup> mantém as propriedades gerais dos azólicos, porém bloqueia mais intensamente a síntese de ergosterol dos fungos filamentosos para os quais chega a ser fungicida. Também mostra ação sobre espécies de *Aspergillus* mais intensa do que o itraconazol inclusive sobre o *A. terreus* que comumente é resistente à anfotericina B. É fungistático para espécies de *Candida*, inclusive aquelas resistentes ao fluconazol (Diakema et al. 2003, Johnson & Kauffman 2003, Martinez 2006).

O posaconazol possui composição química similar ao itraconazol, disponível em formulação oral, mas ainda com atividade pouco conhecida em humanos. Experimentos com animais mostram atividade em aspergilose pulmonar ou disseminada (Kirkpatrick et al. 2000, Petraitiene et al. 2001, Cornely et al. 2007).

Entre os poliênicos, o antifúngico mais usado é a anfotericina B que pertence à ampla família dos macrolídeos que atua ligando-se ao ergosterol da membrana celular fúngica. Neste sentido, altera a permeabilidade da membrana, promovendo o

desequilíbrio osmótico pela perda de íons intracelulares e consequentemente produzindo a lise e morte celular (Vanden Bossche 1997). A anfotericina B produz efeitos adversos sendo mais comuns a nefrotoxicidade e a anemia. Outras reações adversas incluem plaquetopenia, dispnéia, hipotensão arterial, arritmia cardíaca e toxicidade neurológica, além de tromboflebite no local de aplicação. Embora seja de uso limitado devido aos seus efeitos tóxicos e necessidade de aplicação endovenosa, a anfotericina B é o antimicrobiano/antifúngico mais empregado em casos de infecções fúngicas invasivas, particularmente em imunossuprimidos, na doença disseminada em imunocompetentes. Terapia com anfotericina B é usada em casos de criptococose, aspergilose, infecções disseminadas por *Candida* spp. resistente a triazólicos e infecções por certos agentes de feohifomicose e de hialohifomicose.

Casposfungina, micafungina e anidulafungina são equinocandinas cuja ação se baseia na capacidade que estas substâncias têm de interferir com a síntese da parede celular pela inibição da  $\beta$  (1,3)-glucana sintase, impedindo a síntese de glucanas. O bloqueio da síntese de glucanas produz o desequilíbrio osmótico, o que pode interferir na viabilidade da célula fúngica (Martinez 2006). Todas as equinocandinas só podem ser administradas por via intravenosa sendo que, normalmente são bem toleradas com poucos efeitos adversos que incluem a liberação de histamina.

A casposfungina é a principal equinocandina, sendo fungistática para espécies de *Aspergillus* e com ação fungicida sobre diferentes espécies de *Candida*, incluindo as amostras resistentes ao fluconazol e a anfotericina B (Denning 2003).

A duração prolongada de neutropenia com subsequente risco de aspergilose em TCTH alogênico faz com que haja recomendações para o uso profilático de agentes antifúngicos. O itraconazol, a anfotericina B lipossomal e o posaconazol têm demonstrado eficácia na prevenção de infecções por fungos filamentosos em receptores de transplantes. O uso de profilaxia anti-*Aspergillus* também tem sido recomendado para pacientes com leucemia mielóide aguda e síndromes mielodisplásicas durante os períodos de neutropenia prolongada (Marr et al. 2002, Winston et al. 2003, Patterson 2005, Ullmann et al. 2007, Walsh et al. 2008, Rijnders et al. 2008).

O risco de adquirir CI também é elevado durante o período pós-transplante devido à neutropenia, processos inflamatórios da mucosa e ainda devido à presença de catéter venoso central que é bastante comum nestes pacientes. O fluconazol é o fármaco de escolha para a profilaxia da CI em receptores de enxerto e pode ser iniciado logo após o TCTH alogênico ou ainda quando a neutropenia é prolongada. Baixa dose de

fluconazol tem eficácia variável e, portanto, doses inferiores a 200 mg não são recomendadas. O período de uso de fluconazol como agente profilático não está definido, mas seu uso por 75 dias após o transplante está associado com proteção prolongada contra a CI (Marr et al. 2009).

Diante do exposto, o diagnóstico e tratamento precoce das infecções fúngicas é de grande interesse para reduzir as taxas de mortalidade nos TCTH.

## 2 JUSTIFICATIVA

---

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm emergido nas últimas duas décadas como uma das principais micoses causadoras de infecções nosocomiais principalmente em pacientes com doenças imunológicas graves. Nestes pacientes, em especial, estão os portadores de doenças hematológicas e os transplantados de medula óssea (TMO) ou TCTH (Karkowska-Kuleta et al. 2009, Metin et al. 2011). Estas infecções denominadas oportunistas são de evolução rápida, de diagnósticos difíceis, resultando em crescente índice da taxa de mortalidade entre estes pacientes (Cornely 2008, Walsh et al. 2008).

Entre os fungos predominantes nas infecções nosocomiais principalmente nos pacientes TCTH estão incluídas as espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, além de fungos da ordem Mucorales (Richardson & Lass-Flörl 2008).

O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas nosocomiais que envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas, acometendo geralmente pacientes que são expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Entre as infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, vale salientar a relevância clínica dos casos de infecção da corrente sanguínea, complicação esta conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica (Colombo et al. 2003). *Aspergillus* spp. tem se tornado causa comum de infecções nosocomiais em pacientes altamente imunocomprometidos em que se verifica uma profunda neutropenia. Pacientes com doenças malignas hematológicas, TCTH ou de órgão sólido ou ainda que receberam terapia de corticosteróides são normalmente os indivíduos mais acometidos por *Aspergillus* spp. (Fridkin & Jarvis 1996, Patterson, 1999).

Segundo Nucci (2003), fungos filamentosos como *Fusarium* spp e Zigomicetos (*Rhizopus*, *Mucor* e *Absidia*) podem aparecer como causas significativas de micoses invasivas em pacientes severamente imunocomprometidos. Outros fungos como *Trichosporon* spp, *Rhodotorula* spp, *Geotrichum capitatum*, *Acremonium* spp, *Scedosporium* spp, *Paecilomyces* spp, *Trichoderma* spp. e dematiáceos como *Bipolaris* spp, *Cladophialophora* spp. e *Alternaria* spp. são considerados patógenos emergentes, tendo sido relatados com grande frequência. Um dos grandes problemas inerentes a estas infecções reside no fato de serem dificilmente diagnosticadas ou diagnosticadas tardiamente, fazendo com que a doença seja letal.

Desta forma o diagnóstico de infecções oportunistas faz-se de extrema necessidade. A detecção de GM para o diagnóstico de AI em pacientes submetidos a transplante servirá provavelmente para avaliação precoce da doença.

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 Objetivo Geral

Verificar a incidência de infecções fúngicas nos pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas.

### 3.2 Objetivos Específicos

1- Isolar e identificar fungos filamentosos e leveduriformes de amostras clínicas de sangue dos pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas.

2- Determinar os principais fatores de risco para aspergilose.

3- Avaliar se a detecção de galactomanana no soro pode ser útil no diagnóstico de aspergilose.

4- Determinar *in vitro* as concentrações inibitórias dos antifúngicos itraconazol, voriconazol, fluconazol e anfotericina B para os isolados de *Aspergillus* spp.

5- Determinar *in vitro* as concentrações inibitórias dos antifúngicos voriconazol, fluconazol, caspofungina e anfotericina B para os isolados de *Candida* spp.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 Amostras Clínicas

Foram analisadas 392 amostras de sangue provenientes de 117 pacientes TCTH do Hospital Araújo Jorge em Goiânia-GO no período de dezembro de 2008 a julho de 2011. Todos os pacientes com doenças hematológicas graves e submetidos ao TCTH alogênico ou autólogo concordaram em participar da pesquisa e deram consentimento informado por escrito (Anexo 1 a 3). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás (ACCG), protocolo nº 055/2008 (Anexo 4). Os dados relativos aos principais fatores de risco destes pacientes como neutropenia, uso de antibióticos de amplo espectro e de catéter venoso central foram catalogados de acordo com o prontuário do Hospital Araújo Jorge.

### 4.2 Isolamento e identificação dos fungos

A colheita de material clínico (sangue) foi realizada assepticamente (aproximadamente 5 mL) em dois tubos a vácuo. Um tubo (sem anticoagulante) foi usado para obtenção do soro na detecção de GM e o outro tubo com anticoagulante (*Ethylene Diamine Tetra Acetec Acid* - EDTA) foi usado para hemocultura. O sangue com anticoagulante foi semeado em tubos de ensaio contendo meio de cultura bifásico com uma fase sólida de ágar *brain heart infusion* (BHI) e a fase líquida de caldo BHI. Estes tubos foram incubados a 37°C a temperatura ambiente, examinados e homogeneizados diariamente. Após crescimento, os fungos isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose para posterior identificação (Telles Filho & Severo 1997). As culturas foram consideradas positivas quando havia o crescimento do fungo em, pelo menos, três tubos e em duas diferentes amostras clínicas coletadas em períodos distintos.

A identificação dos fungos filamentosos foi realizada através de características macroscópicas e microscópicas. O microcultivo em lâmina foi realizado para auxiliar na identificação das espécies de *Aspergillus*. Esta técnica, que consiste no crescimento do fungo em uma pequena quantidade de ágar batata, permite o desenvolvimento dos

elementos de frutificação assexuados que são importantes na identificação destes microrganismos.

Para as leveduras do gênero *Candida*, a identificação foi realizada de acordo com Kurtzman & Fell (1998), usando a técnica de produção de tubo germinativo em soro fetal bovino, produção de clamidoconídios em ágar corn meal suplementado com 1% de tween 80 e teste de assimilação de hidratos de carbono (Auxanograma). Concomitantemente estes isolados foram inoculados em meio de CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France) para identificação presuntiva da espécie.

#### **4.3 Diagnóstico por Galactomanana (GM)**

A detecção de GM foi feita através do kit Platelia *Aspergillus* EIA (Laboratório Bio-Rad, Marnes, França) realizada segundo as instruções do fabricante.

As análises foram feitas no soro tratado com solução ácida de EDTA, aquecidos em banho maria por 3 minutos a 100°C e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante do soro (50 µL) foi colocado nos poços das microplacas (96 orifícios) previamente adicionadas de anticorpos monoclonais de antigalactomanana marcados com peroxidase. A placa foi vedada com parafilme e incubada a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 90 minutos. Após este período, o conteúdo da placa foi aspirado e cada poço lavado com tampão tris NaCl, Tween<sup>®</sup> 20 a 1%, timerosal 0,01% e água destilada por 5 vezes e secados. Em seguida foi adicionado a cada orifício tampão e solução de tetrametilbenzidina que é considerado o substrato cromógeno. O tampão é constituído de solução de ácido cítrico e acetato de sódio diluído em peróxido de hidrogênio a 0,009% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 4%, enquanto a solução cromogênica é constituída de tetrametilbenzedina a 0,6% em DMSO a 90%. A placa foi então incubada a temperatura de 25°C por 30 minutos na ausência de luz. Solução de parada com ácido sulfúrico 1N (100 µL) foi adicionada e a base da placa foi seca. A leitura foi realizada após 30 minutos da adição da solução de parada em aparelho de ELISA em uma densidade ótica (DO) de 450 nm, sendo que valores de DO > 0,5 foram considerados como positivos.

Em todas as análises de detecção de GM, soro negativo (negativo para GM, anticorpos HIV-1, HIV-2 e HCV), soro positivo (contem GM) e soro controle *cut-off* (soro humano que contém GM liofilizado) foram usados como controle. Para definir a

infecção como aspergilose invasiva foi usado o consenso de *European Organization of the Research and treatment of Cancer/Mycoses Study Group- EORTC/MSG* (Ascioglu et al. 2012). Casos provados de aspergilose invasiva foram definidos como crescimento do fungo da amostra do sangue e casos prováveis foram determinados como infiltrados pulmonares visualizados em tomografia computadorizada do tórax e detecção de GM do soro por ELISA. O consenso estabelece que exista a possibilidade de aspergilose invasiva quando há infiltrados pulmonares, mas sem evidências microbiológicas e ainda sem detecção de GM (Ascioglu et al. 2012).

#### **4.4 Suscetibilidade *in vitro***

A suscetibilidade *in vitro* para os fungos filamentosos e para leveduras foi realizada utilizando a metodologia de microdiluição em caldo seguindo os documentos M38-A (2002) e M27-A3 (2008) propostos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

##### **4.4.1 Agentes Antifúngicos**

Itraconazol, fluconazol, voriconazol e anfotericina B foram utilizados para verificar a suscetibilidade *in vitro* dos fungos filamentosos enquanto fluconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina foram usados para leveduras. Estes antifúngicos foram obtidos na forma de pó dos seus respectivos fabricantes, dissolvidos em DMSO (Dimetilssulfóxido) ou água destilada e diluídos em RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 mol/L de tampão MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico) para pH 7,0 e esterilizado por filtração (Tabela 1).

Tabela 1. Agentes antifúngicos, procedência, solventes e variações das concentrações usadas no teste de suscetibilidade *in vitro*.

<b>Antifúngico</b>	<b>Procedência</b>	<b>Solvente</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
Itraconazol	Janssen-pharmaceuticals	DMSO	0,0313 – 16
Fluconazol	Pfizer	H <sub>2</sub> O destilada	0,125 – 64
Voriconazol	Pfizer	DMSO	0,0313 – 16
Anfotericina B	Squibb	DMSO	0,0313 – 16
Casposfungina	Meck Sharp & Dohme	DMSO	0,015 – 8

#### **4.4.2 Preparo do Inóculo**

##### **4.4.2.1 Leveduras**

Os isolados de leveduras foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas a temperatura ambiente. Uma suspensão foi preparada em salina a 0,85% esterilizada e a densidade celular medida em espectrofotometria para uma transmitância de 85% em  $\lambda$  (comprimento de onda) de 530 nm. Esta suspensão foi posteriormente diluída 1:50 e a seguir 1:20 em caldo RPMI 1640 de modo a permitir uma concentração final do inóculo de 1 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL.

##### **4.4.2.2 Fungos Filamentosos**

Os fungos filamentosos foram cultivados em ágar-batata dextrose durante 7 dias a 35°C para a produção de conídios. A estes tubos foram adicionados 10 mL de salina estéril (0,85%) sendo que a suspensão resultante contendo conídios e hifas foram transferidas para um tubo estéril que permaneceu em repouso por 10-15 minutos para sedimentação das partículas mais pesadas. A suspensão contendo o inóculo foi ajustada em espectrofotômetro com  $\lambda$  de 530 nm de tal modo a produzir uma transmitância de aproximadamente 80% o que equivale a 0,6 a  $1,4 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, a suspensão foi diluída em caldo RPMI 1640 de tal modo a se obter uma concentração final de 0,4 a  $5 \times 10^4$  UFC/mL.

#### 4.4.2.3 Realização e Leitura do Teste

Foram utilizadas placas de microtitulação contendo 96 poços. Em cada poço foram pipetados 100  $\mu$ L do agente antifúngico em diferentes concentrações e 100  $\mu$ L do inóculo.

A leitura foi realizada para fungos filamentosos 72 horas e para leveduras 48 horas após incubação ambos a temperatura de 35°C. Para fungos filamentosos, a concentração inibitória mínima (CIM) de itraconazol, voriconazol e anfotericina B foi definida como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir o crescimento total do microrganismo enquanto para fluconazol a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento do microrganismo, comparado ao controle (livre do agente antifúngico). Para leveduras, a CIM de derivados azólicos e de caspofungina foi definida como a menor concentração capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento do microrganismo enquanto para anfotericina a leitura foi realizada como inibição total de crescimento.

As leveduras foram consideradas como resistentes seguindo valores de CIM preconizados no documento M27-A3 (2008) do CLSI em concentrações  $\geq 64$   $\mu$ g/mL para o fluconazol,  $> 2$   $\mu$ g/mL para caspofungina e  $\geq 4$   $\mu$ g/mL para voriconazol. Para anfotericina B valores de CIM  $> 1$   $\mu$ g/mL foram considerados resistentes, como sugerido por estudos de Nguyen et al. (1998).

Como não há critérios estabelecidos para determinar a resistência de fungos filamentosos aos diferentes agentes antifúngicos, não foi realizada a interpretação de resistência dos dados obtidos com relação às concentrações encontradas.

A Figura 1 esquematiza a execução do teste de suscetibilidade *in vitro*. Controle dos agentes antifúngicos, do inóculo e do meio de cultura (RPMI 1640) e uma cepa ATCC 22019 de *C. parapsilosis* foi utilizada em cada teste. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

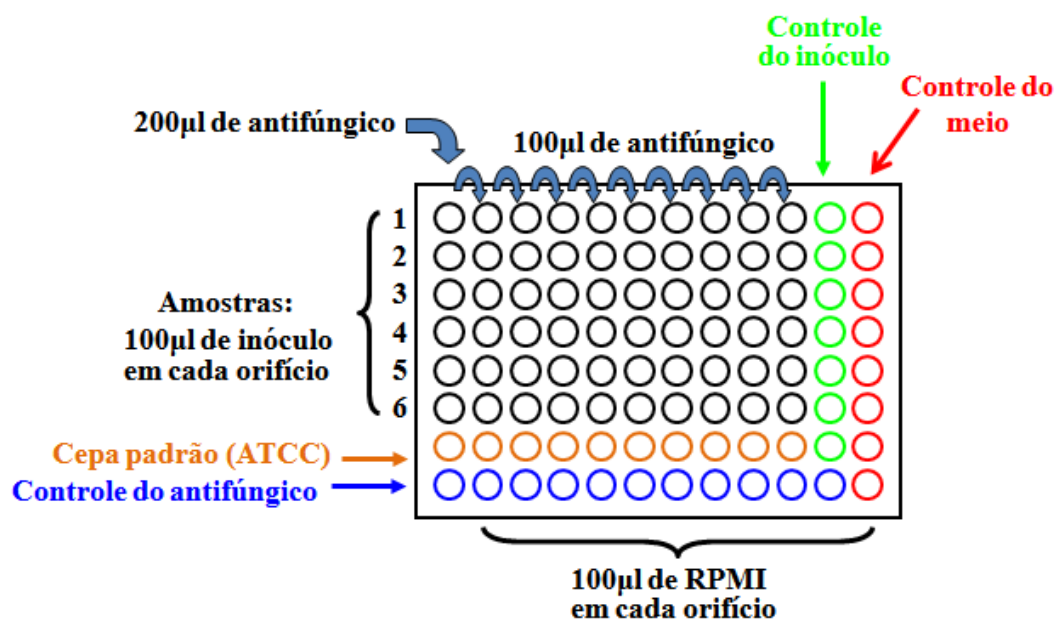


Figura 1. Esquema do procedimento para a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo.

## 5 RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas 392 amostras de soro provenientes de 117 pacientes submetidos a TCTH. As características demográficas, o tipo de transplante e as doenças de base estão apresentados na Tabela 2. A média de idade dos pacientes analisados foi de 35,7 anos e o maior número pertencia à faixa etária entre 21 a 60 anos. Entre os pacientes, 52,2% eram do sexo masculino, 53% receptores alogênicos e verificou-se que diferentes tipos de leucemias (55,5%) foram as mais frequentes doenças de base encontradas. A análise de regressão logística univariada evidenciou que a idade, o sexo, o tipo de transplante de células hematopoiéticas e as doenças de base não estão associados ao risco de morte nos pacientes TCTH.

Tabela 2. Análise das características e fatores de risco dos 117 pacientes TCTH.

Características	n	%
Idade (anos) média=35,7		
0 - 20	26	22,2
21 - 40	39	33,3
41 - 60	38	32,4
> 60	14	12,0
Gênero		
Sexo masculino	61	52,2
Sexo feminino	56	47,8
Tipo de transplante de células tronco hematopoiética		
Autólogo	55	47,0
Alogênico	62	53,0
Doença de base		
LMA	29	24,8
LMC	12	10,2
LLA	24	20,5
LH	15	12,8
LHN	19	16,2
MM	14	12,0
AA	2	1,7
SMD	1	0,9
HPN	1	0,9

LMA - Leucemia Mielóide Aguda, LMC - Leucemia Mielóide Crônica, LLA - Leucemia Linfóide Aguda, LH - Linfoma de Hodgkin, LNH - Linfoma não Hodgkin, MM - Mieloma Múltiplo, AA - Anemia Aplástica, SMD - Síndrome Mielodisplásica, HPN - Hemoglobinúria Paroxística Noturna, n - Número de pacientes.

Segundo levantamento de dados dos prontuários, todos os pacientes recebiam profilaxia com fluconazol, aciclovir e antibióticos como vancomicina.

O isolamento dos fungos em meio de cultura bifásico procedentes de 117 pacientes mostrou um percentual de positividade de 18,8%. Estes fungos foram identificados como leveduras pertencentes ao gênero *Candida* em 16 amostras e fungos filamentosos em 6 amostras.

Entre as culturas positivas para fungos filamentosos foi possível identificar através da técnica de microcultivo em lâmina, dois *Fusarium* sp, um *Acremonium strictum*, dois *A. fumigatus* e um *A. flavus*. A Figura 2 mostra as características microscópicas de *A. flavus* e de *A. fumigatus*.

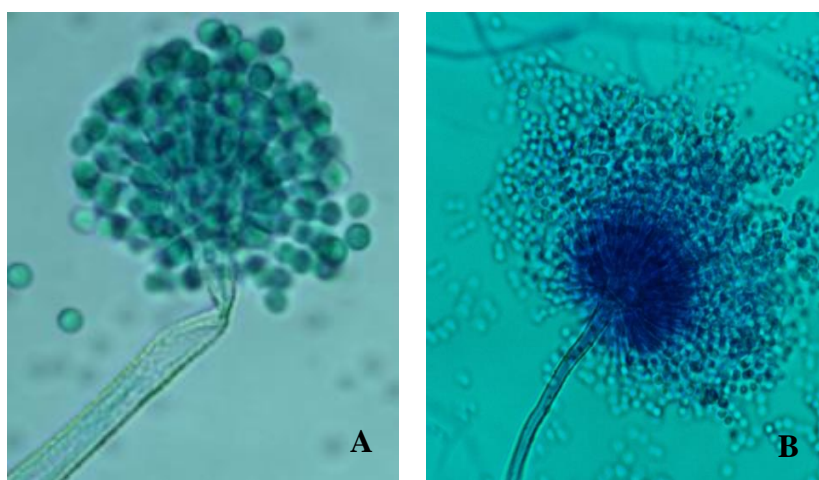


Figura 2. Características microscópicas de fungos do gênero *Aspergillus* obtidas de colônias crescidas em ágar batata. A – *A. fumigatus*; B – *A. flavus* (400X).

As leveduras do gênero *Candida* foram identificadas através do crescimento em CHROMagar (Figura 3), testes de produção de tubo germinativo (Figura 4A), formação de clamidoconídios (Figura 4B) e de assimilação de hidratos de carbono (Figura 4C). *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram isoladas em 6 amostras clínicas (5,1%) cada uma, enquanto *C. albicans* foi detectada em 4 (3,4%).

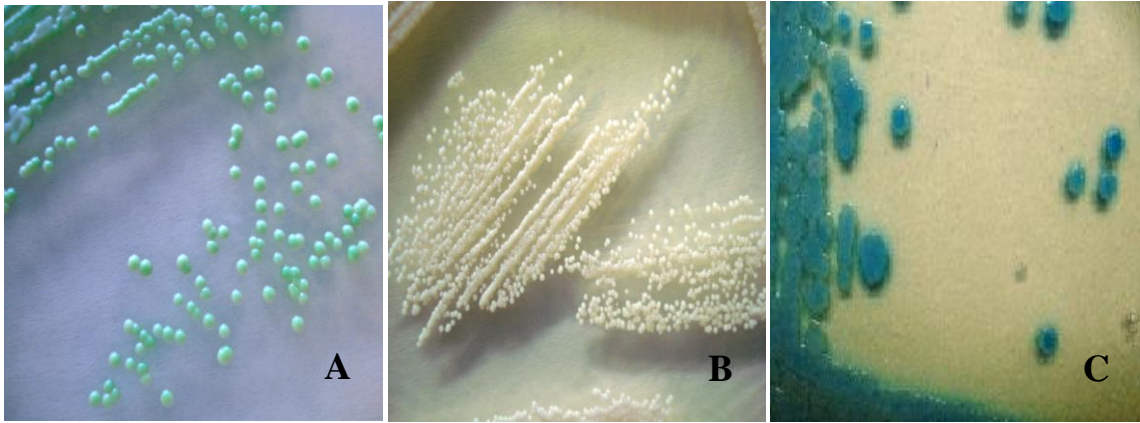


Figura 3. Colônias de *Candida* crescidas em meio de Chromagar A- *C. albicans*, B- *C. parapsilosis*, C- *C. tropicalis*

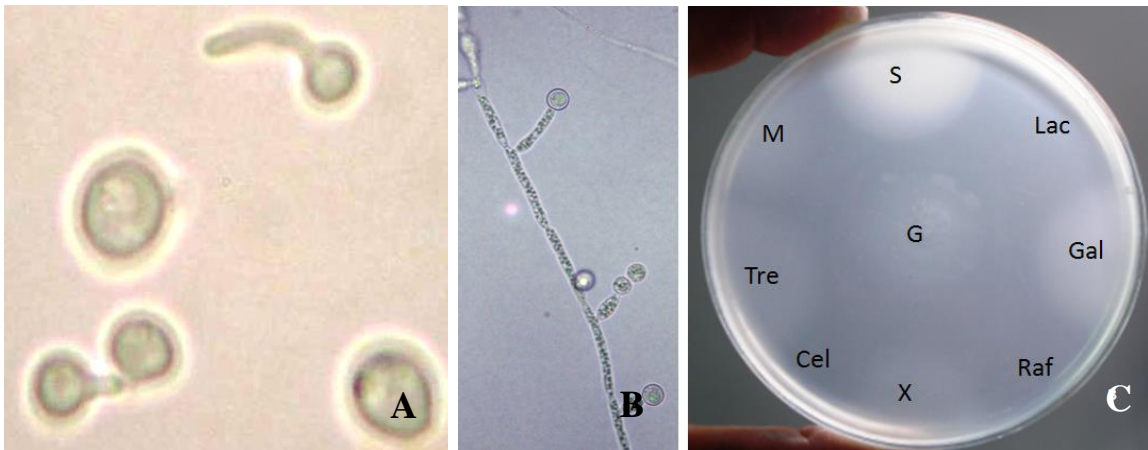


Figura 4. Tubo germinativo (A), Clamidoconídios (B), Assimilação de hidratos de carbono (C).

Dentre as 392 amostras clínicas de sangue analisadas para a detecção do antígeno GM dos 117 pacientes TCTH, 22,7% (89/392) foram positivas em pelo menos 01 amostra. Do total de pacientes analisados 19,6% (23/117) apresentaram 02 ou mais amostras positivas para GM (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de Galactomanana realizada em 392 amostras de sangue de 117 pacientes submetidos a transplantes de células tronco hematopoiéticas.

nº de pacientes	nº amostras coletadas/paciente	nº amostras/paciente	
		GM+	GM-
1	4	3	1
1	5	5	0
1	5	1	4
1	5	2	3
1	5	4	1
1	6	3	3
1	7	7	0
1	8	6	2
1	9	9	0
1	10	9	1
1	11	11	0
1	13	10	3
1	13	11	2
2	6	4	2
2	6	5	1
2	8	8	0
2	8	7	1
3	2	1	1
3	4	2	2
3	5	0	5
3	7	1	6
4	3	1	2
4	4	1	3
4	6	1	5
5	4	0	4
10	3	1	2
11	2	0	2
11	2	0	2
14	1	0	1
21	1	1	0
117	392	194	198

Entre 117 pacientes foram identificados três (2,5%) como provadas AI definido pelo crescimento das espécies de *Aspergillus* em meio BHI e sete (5,9%) como provável AI com detecção de GM no sangue e presença de infiltrados pulmonares. AI definida como possível foi encontrado em três (2,5%) pacientes com alterações radiológicas sugestivas (Figura 5) e GM negativo. Entre esses pacientes provado/provável, a taxa de mortalidade geral foi de 60% (6/10). A análise de regressão logística univariada mostrou que aspergilose estava associada com o risco de morte ( $P < 0,05$ ). A definição de aspergilose invasiva como provada/provável, a detecção de GM e sobrevivência dos pacientes encontram-se na Tabela 4.



Figura 5. Imagem radiográfica de infiltrados pulmonares evidenciando provavelmente uma aspergilose invasiva.

Tabela 4. Definição de aspergilose invasiva relacionada ao crescimento do fungo e detecção de GM com a sobrevivência dos pacientes após o transplante de células tronco hematopoiéticas

Isolado	Provado/provável AI <sup>(a)</sup>	Cultura	GM	Consequência
1	Provado	<i>A. fumigatus</i>	Positivo	Morte
2	Provado	<i>A. fumigatus</i>	Positivo	Morte
3	Provado	<i>A. flavus</i>	Negativo	Morte
4	Provável	Negativo	Positivo	Morte
5	Provável	Negativo	Positivo	Sobrevivente
6	Provável	Negativo	Positivo	Morte
7	Provável	Negativo	Positivo	Sobrevivente
8	Provável	Negativo	Positivo	Sobrevivente
9	Provável	Negativo	Positivo	Sobrevivente
10	Provável	Negativo	Positivo	Morte
11	Possível	Negativo	Negativo	Sobrevivente
12	Possível	Negativo	Negativo	Sobrevivente
13	Possível	Negativo	Negativo	Sobrevivente

GM positivo → Densidade Óptica (DO) valor de 0,5 ng/mL ou superior no soro em duas amostras sequenciais.

<sup>(a)</sup> *European Organization for Research and Treatment of Cancer -EORTC.*

Na análise de diagnóstico de aspergilose definida como provado/provável usando-se o teste de detecção de GM por ELISA considerando um valor de “*cutoff*” de  $\geq 0,5$ , foi verificado que este teste possui uma sensibilidade de 90% (9/10) e uma especificidade de 85,8% (94/107).

Resultados falsos positivos para o teste de GM foram encontrados em pacientes onde foram obtidos das amostras clínicas o crescimento de outros microrganismos. GM resultou teste positivo em duas amostras sequenciais quando se isolou do sangue, *C.*

*albicans* (4), *C. parapsilosis* (3), *C. tropicalis* (4), *Acremonium strictum* (1) e *Fusarium sp.* (1).

O teste de suscetibilidade realizado para as espécies de *Aspergillus* mostrou valores baixos de CIM para voriconazol. No entanto, altas concentrações de anfotericina B e fluconazol foram necessárias para inibir o crescimento de *A. fumigatus* e *A. flavus*. CIM de itraconazol foi elevada para apenas um isolado de *A. fumigatus*. Os valores de CIM de anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol para os isolados de *Aspergillus* são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade *in vitro* de quatro agentes antifúngicos para três isolados de *Aspergillus* obtidos de pacientes TCTH.

Antifúngicos	Isolados / CIM (µg/mL)		
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>
Fluconazol	32	16	>64,0
Itraconazol	>16,0	0,125	0,25
Voriconazol	0,5	0,25	0,25
Anfotericina B	2,0	4,0	4,0

A suscetibilidade *in vitro* das leveduras para diferentes agentes antifúngicos mostrou que a maioria dos isolados de *C. albicans* e de *C. tropicalis* foram resistentes ao fluconazol e ao voriconazol no entanto, *C. parapsilosis* mostrou-se sensível a estes antifúngicos. Anfotericina B e caspofungina foram os antifúngicos que mostraram os menores valores de concentrações inibitórias para todos os isolados. As variações das concentrações, CIM 50 e CIM 90 encontrados para os diferentes antifúngicos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Suscetibilidade *in vitro* de quatro agentes antifúngicos para 16 isolados de *Candida* obtidos de amostras de sangue de pacientes transplantados de células hematopoiéticas.

Espécies (nº de isolados)	Antifúngicos	CIM (µg/mL)		
		Varição	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
<i>C. parapsilosis</i> (n=06)	Fluconazol	0,125 – 2,0	0,5	2,0
	Voriconazol	<0,03 – 0,25	<0,03	0,25
	Anfotericina B	0,125 – 0,5	0,25	0,5
	Caspofungina	0,5 – 1,0	1,0	1,0
<i>C. albicans</i> (n=04)	Fluconazol	0,5 - >64,0	>64,0	>64,0
	Voriconazol	<0,03 – >16,0	>16,0	>16,0
	Anfotericina B	0,25 – 0,5	0,25	0,5
	Caspofungina	<0,03 – 0,125	0,06	0,125
<i>C. tropicalis</i> (n=06)	Fluconazol	8,0 – >64,0	16,0	>64
	Voriconazol	0,06 – 16	0,125	16
	Anfotericina B	0,125 – 0,5	0,5	0,5
	Caspofungina	<0,03 – 0,25	<0,03	0,25

## 6 DISCUSSÃO

---

O transplante de medula óssea é uma modalidade terapêutica que beneficia um grande número de pacientes com câncer ou com outras doenças. Estes transplantes estão normalmente associados a leucemias como já detectados por diferentes pesquisadores (Nucci & Maiolino 2000, Rieger et al. 2009). Cerca de 55,5% dos pacientes estudados neste trabalho tiveram como principal causa de realização de transplante um tipo de leucemia aguda ou crônica.

Com relação a idade e gênero Bhayat et al. (2010) observaram que a população de transplantados é semelhante entre homens e mulheres, cerca de 5% maior no gênero masculino com faixa etária mais comum em indivíduos com idade inferior a 70 anos. Resultados semelhantes foram verificados na população deste trabalho, o qual era constituído de 52,2% de homens e a faixa etária que mais se realizou transplante foi de 21 a 60 anos.

Os receptores de TCTH tanto autólogos como os alogênicos apresentam riscos para a AI, mas a população alogênica que é associada com enxerto-versus-hospedeiro possui maior risco de AI (Herbrecht et al. 2002). De acordo com Singh & Paterson (2005), a AI ocorreu de 8-15% nos pacientes alogênicos submetidos ao TCTH. Embora no presente estudo 60% (6/10) eram transplantados alogênicos, a regressão logística univariada não foi significativa quando comparada com pacientes autólogos (40%).

Os fungos, tanto os filamentosos como as leveduras são microrganismos bastante comuns em pacientes submetidos a transplante seja de órgão sólido ou de medula (Rieger et al. 2009, George & Alangaden 2011). Espécies de *Aspergillus* e *Candida* se apresentam como as causas mais comuns de IFIs em pacientes TCTH (Richardson & Lass-Flörl 2008, George & Alangaden 2011, Pagano et al. 2011). Neste trabalho, o percentual encontrado para candidíase foi maior que para aspergilose, sendo que dos 117 pacientes estudados foram isolados 2,5% (03/117) de *Aspergillus* e 13,6% (16/117) de leveduras todas pertencentes ao gênero *Candida*. Rieger et al. (2009) verificaram que de 59 pacientes transplantados de medula óssea do tipo alogênico, 11,8% apresentaram infecções invasivas por fungos do gênero *Candida*. Pagano et al. (2007) observaram em 5 anos que de 3228 (3,7%) pacientes TCTH, 121 tiveram IFI e destes, 71% tiveram AI e 25% tiveram candidíase. Considerando ainda que em muitos casos a reação de GM resultou positiva em mais de uma amostra sem correlação com

cultivo positivo para *Aspergillus*, pode-se sugerir que a aspergilose é mais frequente do que quando se leva em consideração apenas a cultura.

O uso de tratamento profilático realizado com derivados azólicos que são capazes de agir sobre *C. albicans*, espécie que durante muitos anos foi a mais comum encontrada nas infecções (Leroy et al. 2009), fez com que outras espécies emergissem como agente de candidíase. Os resultados deste estudo mostram o aumento de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (37,5%) com relação a *C. albicans* (25,0%). Celebi et al. (2007) observaram esta similaridade de comportamento para *C. parapsilosis* como a principal responsável por candidíase invasiva. Esta espécie é considerada agente de infecções de origem exógena capaz de colonizar a pele, tendo sido isolada de mãos de profissionais, de soluções glicosadas de uso hospitalar e de cateter venoso central. Segundo Boualem et al. (2006) as espécies não *albicans* estão associadas a neoplasia, neutropenia e ao uso prévio de fluconazol.

Entre as espécies de *Aspergillus* destacam-se *A. fumigatus* e *A. flavus* como as mais isoladas como agentes de aspergilose (Heinemann et al. 2004, Krishnan et al. 2008). Neste trabalho, de três isolados do gênero *Aspergillus*, dois foram identificados como *Aspergillus fumigatus* e um como *Aspergillus flavus*. Pagano et al. (2007) em 91 casos de aspergilose em pacientes transplantados, o percentual de *A. fumigatus* foi de aproximadamente 65%, sendo que outras espécies como *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. niger* e *A. terreus* foram identificadas em menor número (Fukuda et al. 2003, Pagano et al. 2007). Morgan et al. (2005), de 72 casos de aspergilose em pacientes transplantados, 56% foram identificados como a *A. fumigatus*, 18,7% como *A. flavus*, 16% como *A. terreus*, 8% como *A. niger* e 1,3% como *A. versicolor*.

AI é uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes TCTH. O diagnóstico de AI é um desafio porque os sinais clínicos e radiológicos não são específicos e a biópsia do tecido é invasiva e nem sempre é possível como meio de diagnóstico (Pfeiffer et al. 2006). A incorporação dos resultados microbiológicos como a cultura pode melhorar o diagnóstico de AI mas este método poderia levar um longo tempo e resultados negativos podem ocorrer. O impacto do diagnóstico precoce conduz a uma terapia apropriada resultando em melhor prognóstico do paciente (Husain et al. 2007). Desta maneira, a detecção de GM em fluidos corporais tornou-se uma ajuda útil no diagnóstico da AI (Pfeiffer et al. 2006). Assim, o teste de GM tem ganhado aceitação como um método sensível a vigilância prospectivo de risco (Marr et al. 2005).

No presente trabalho, a análise do antígeno GM pode representar uma detecção precoce da doença, sendo considerado um bom indicador clínico e assim reduzir os índices de mortalidade e morbidade desta doença. A elevada porcentagem de amostras positivas encontrada entre os pacientes transplantados e que apresentam uma neutropenia acentuada determina forte indício de doença invasiva. Christopher et al. (2006) mostraram que o GM apresenta uma especificidade de 89% para os casos comprovados de AI e uma precisão moderada para o diagnóstico da AI em pacientes imunocomprometidos. Uma sensibilidade de 61% e uma especificidade de 98% têm sido relatados em pacientes TCTH por Husain et al. (2007), enquanto Pfeiffer et al. (2006) mostram uma sensibilidade de 82% e especificidade de 86% nesses pacientes. A especificidade encontrada no presente estudo quando se considerou AI provada/provável segundo a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* foi de 85,8% (94/107) corroborando com os achados acima.

A detecção de GM pode ser influenciada pelo tratamento antifúngico como relatado por Marr et al. (2004) que verificaram sensibilidade de 87,5% ao GM nos pacientes não submetidos à terapia antifúngica contra 20% nos paciente submetidos à terapia. A sensibilidade ao GM do presente estudo foi de 90,0% (9/ 10 de AI provada/provável) e os pacientes receberam tratamento profilático com fluconazol que era protocolo de rotina para prevenir a IFI em pacientes TCTH autólogos e alogênicos (Reich et al. 2001, Junghanss et al. 2002, Fukuda et al. 2003, Jantunen et al. 2004, Pagano et al. 2007). Os resultados falsos positivos encontrados no presente trabalho são de explicações mais complexas. No entanto, alguns pesquisadores apontam que o uso de medicamentos como antibióticos, a colonização das vias aéreas ou até mesmo a contaminação laboratorial por espécies de *Aspergillus* podem levar a resultados positivos de GM (Ansorg et al. 1997, Maertens et al. 2002). Resultados falsos positivos podem ocorrer em crianças devido a passagem pela mucosa do trato gastrointestinal de GM presente no leite ou nutrientes ricos em proteínas (Siemann et al. 1998, Gangneux et al. 2002). Devido ao fato de que pacientes que possuem doença hematológica maligna ou que tenha sido submetidos ao TCTH serem altamente sujeitos a aspergilose, este teste é de grande valor (Christopher *et al.* 2006).

AI é considerada como um preditor de morte entre os pacientes TCTH (Barnes & Marr 2007, Parody et al. 2009). Entre os pacientes com AI provada/provável o índice de morte foi de 60% nos transplantados estudados, mostrando que este é um preditor significativo para o aumento do risco de morte ( $P < 0,05$ ). Similar a estes resultados

Fukuda et al. (2003) observaram que AI está associada a mortalidade elevada, variando de 30% a 70% em receptores de transplante.

O uso clínico de voriconazol utilizado em infecções por *Aspergillus* spp e por outros fungos filamentosos oportunistas é comum. Um estudo randomizado em pacientes com aspergilose pulmonar invasiva mostrou a superioridade deste triazólico sobre a anfotericina B, tanto em relação a respostas favoráveis como na sobrevivência do paciente (Herbrecht et al. 2002). O teste de suscetibilidade *in vitro* realizado no trabalho mostrou que este antifúngico apresentou os menores valores de CIM. Shivaprakash et al. (2010) verificaram que este fármaco mostrou excelente atividade antifúngica para isolados de *Aspergillus*.

Resistência de *Candida* spp aos diferentes agentes antifúngicos tem sido pouco observada. Fluconazol é um medicamento com grande vantagem no tratamento de candidíase, pois apresenta um perfil baixo de toxicidade e boa eficácia (Chen et al. 2009). Os resultados verificados no trabalho mostraram resistência de *C. albicans* ao fluconazol, no entanto, as outras espécies encontradas foram suscetíveis a este medicamento. Outros estudos também descrevem a resistência das espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal de pacientes com diabetes mellitus (Manfredi et al. 2006, Furlaneto-Maia et al. 2008).

A suscetibilidade *in vitro* dos 16 isolados de *Candida* identificados em nossa casuística mostrou que isolados de *C. tropicalis* (37,5%) foram resistentes ao voriconazol. Este antifúngico apresenta maior atividade do que fluconazol contra os isolados de *Candida*, entretanto Cendejas-Bueno et al. (2010) verificaram resistência de várias espécies de *Candida* a este antifúngico em isolados clínicos obtidos na Espanha, sendo que maior resistência foi verificada com outras espécies não *C. albicans*.

Anfotericina B e caspofungina possuem excelente atividade *in vitro* para as espécies de *Candida*. Todos os isolados de *Candida* estudados apresentaram-se suscetíveis a estes antifúngicos. Segundo Keating & Figgitt (2003) valores de CIM para os isolados de *Candida* são baixos para anfotericina B e para caspofungina. Em testes de suscetibilidade *in vitro* caspofungina mostra atividade contra espécies de *Candida*, inclusive amostras resistentes aos derivados azólicos e a anfotericina B. Resistência a anfotericina B é geralmente incomum e ocorre normalmente para espécies não *albicans* (ST-Germain et al. 2001). Reduzida suscetibilidade a anfotericina B tem sido verificado principalmente com *C. lusitanae*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Krogh-Madsen et al. 2006).

A provável justificativa para a alta resistência dos fungos aos derivados azólicos encontradas nesse trabalho deve-se à origem das amostras clínicas. Dados de candidíase invasiva dos pacientes transplantados mostram que o tratamento é difícil e resulta na morte dos pacientes.

Em relação às outras espécies de fungos encontradas no presente estudo, *Acremonium* sp (0,8%) e *Fusarium* sp (1,7%) são apontados como patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos (Nucci & Anaissie 2002, Nucci et al. 2004, Beltrame et al. 2009, Das et al. 2010).

Considerando a alta taxa de mortalidade devido à aspergilose invasiva e que a terapia precoce pode melhorar o prognóstico, os resultados encontrados nesse trabalho permitem sugerir que a detecção de GM no soro de pacientes que apresentam um elevado risco de adquirir a doença pode ser uma excelente ferramenta para identificação de aspergilose invasiva.

## 7 CONCLUSÕES

---

1. Como já estabelecido em casuísticas anteriores, as leucemias aguda ou crônica representaram as principais causas de transplante de medula óssea.
2. Fungos dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* foram os mais isolados mostrando uma elevada incidência nos pacientes transplantados.
3. Entre as espécies de *Aspergillus* verificou-se o predomínio de *Aspergillus fumigatus*, coincidente com a descoberta de outros pesquisadores enquanto que entre as espécies de *Candida* verificou-se que *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram as mais comuns, evidenciando o crescimento de *Candida* não *albicans* como agentes de processos infecciosos.
4. O resultado de duas ou mais amostras positivas para GM em 23 pacientes, nos quais 10 deles foram classificados como aspergilose invasiva provada/provável com uma especificidade de 85,8% (94/107) mostra que este teste deve ser usado como auxiliar no diagnóstico precoce da doença, podendo reduzir os índices de mortalidade e morbidade.
5. Os resultados comprovam por meio do teste de suscetibilidade *in vitro* que voriconazol é um bom fármaco e pode ser utilizado para terapia de aspergilose.
6. A resistência detectada por isolados de *C. albicans* ao fluconazol mostra a importância da realização de testes de suscetibilidade *in vitro* para a terapia adequada de candidíase. Da mesma forma, a suscetibilidade aos novos antifúngicos como voriconazol e caspofungina faz com que estes medicamentos, provavelmente, sejam os mais recomendáveis.

## REFERÊNCIAS

---

Alangaden GJ 2011. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin N Am* 25: 201–225.

Alonso MAS, Ramos IJ, Lleti´ MS, Pema´n J 2006. Epidemiology of invasive fungal infections due to *Aspergillus* spp. and Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect* 12(7): 2-6.

Ansorg R, Van der Boom R, Rath PM 1997. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 40: 353–357.

Ascioglu S, Rex JH, 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 2012. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 34: 939-943.

Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, Oster RA, Anaissie EJ, Walsh TJ, Schuster MG, Wingard JR, Patterson TF, Ito JI, Williams OD, Chiller T, Pappas PG and the Transplant Associated Infection Surveillance Network 2010. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 50(12): 1559–1567.

Barnes PD, Marr KA 2007. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Brit J Haematol* 139: 519-531.

Beltrame A, Sarmatia L, Cudillo L, Cerretti R, Picardi A, Anemona L, Fontana C, Andreoni M, Arcese W 2009. A fatal case of invasive fungal sinusitis by *Scopulariopsis acremonium* in a bone marrow transplant recipient. *Int J Infect Dis* 13(6): 488-492.

Bhatti Z, Shaukat A, Almyroudis NG, Segal BH 2006. Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia* 162: 1-15.

Bhayat F, Das-Gupta E, Hubbard R 2010. Bone marrow transplantation in AML, and socioeconomic class: a UK population-based cohort study. *BMC Cancer* 10: 514.

Bodey GP 1966. Fungal infections complicating acute leukemia. *J Chronic Dis* 19: 667-687.

Borg-von ZM, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Gross U Weig M 2007. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J. Antimicrob Chemother* 60: 424-8.

Boualem Sendid; Claire Lacroix; Marie-Elisabeth Bougnoux. 2006. Is *Candida kefyr* an Emerging Pathogen in Patients with Oncohematological Diseases? *Clin Infect Dis* 43: 664–666.

Brown, JMY 2007. Fungal infections after hematopoietic cell transplantation. Thomas' Hematopoietic cell transplantation, *Third Edition Ed. Blackwell Publishing Ltda*, pp. 683.

Carol Garcia-Vidal, Arlo Upton, Katharine A. Kirby, Kieren A. Marr. 2008. Epidemiology of Invasive Mold Infections in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Biological Risk Factors for Infection According to Time after Transplantation. *Clin Infect Dis* 47: 1041–1050.

Celebi S, Hacimustafaoglu M, Ozdemir O, Ozkaya G. 2007. Nosocomial candidemia in children: results of a 9-year study. *Mycoses* 51: 248-257.

Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M 2010. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J Clin Microbiol* 48: 1895-1899.

Chen PL, Lo HJ, Wu CJ, Lee HC, Chang CM, Lee NY, Wang AH, Lin WL, Ko NY, Lee CC, Ko WC 2009. Species distribution and antifungal susceptibility of blood *Candida* isolates at a tertiary hospital in southern Taiwan 1999-2006. *Mycoses* 54: 17-23.

Christopher D. Pfeiffer, Jason P. Fine, and Nasia Safdar. 2006. Diagnosis of Invasive Aspergillosis Using a Galactomannan Assay: A Meta-Analysis. *Clin Infect Dis* 42: 1417–1427.

Clinical And Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. M38-A. CLSI, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. CLSI, 2008.

Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini MLM, Kussano EJU, Nucci M 2003. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 41: 235-239.

Como JA, Dismukes WE 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med*. 330: 262-272.

Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, Ebrahimi R, Ullmann AJ, Bouza E, Heussel CP, Lortholary O, Rieger C, Boehme A, Aoun M, Horst MH, Thiebaut A, Ruhnke M, Reichert D, Vianelli N, Krause SW, Olavarria E, Herbrecht R. 2007. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin Infect Dis*.44: 1289–1297.

Cornely AO 2008. *Aspergillus* to Zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive of invasive fungal infections. *Infection* 36: 296-313.

Das S, Saha R, Ahmad Dar S, Ramachandran VG 2010. *Acremonium* species: A Review of the Etiological Agents of Emerging Hyalohyphomycosis. *Mycopathologia* 170: 361-75.

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

Denning DW. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362: 1142–51.

Diakema DJ, Messer AS, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. 2003. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin

B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 41: 3623-3626.

Dvorak C.C, Steinbach WJ, Brown JM, Agarwal R. 2005. Risks and outcomes of invasive fungal infections in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 36: 621–629.

Fidel JPL 2002. The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal model. *Int Rev Immunol Philadelphia* 21: 515-548.

Fotedar R, Al-Hedaithy SSA 2003. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses* 48: 62–67.

Fox JL 2001. Clothing spread *Aspergillus* spores. *Current Topics Am S Microbiol News* 67: 238-240.

Fridkin SK, Jarvis WR 1996. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. *Clin Microbiol Rev.* 9: 499-511.

Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Martin PJ, Storb RF, Marr KA. 2003. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 102: 827–833.

Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, Oliveira MT, Furlaneto MC 2008. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals *Mycopathologia* 166: 209-217.

Galván B, Mariscal F 2006. Epidemiologia de la candidemia em UCI. *Rev Iberoam Micol* 23: 12-15.

Gangneux, JP, Lavarde D, Bretagne S, Guiguen C, Gandemer V. 2002. Transient *Aspergillus* antigenemia: think of milk. *Lancet* 359: 1251.

George J, Alangaden MD. 2011. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin N Am* 25: 201–225.

Ghannoum MA, Hossain MA. 2000. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opinion on Invest Drugs* 9: 1797-1813.

Groll AH, Shah PM, Menzel C, Schneider M, Just-Muebling G, Hubner K 1996. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infection* 33: 23-32.

Heinemann S, Symoens F, Gordts B, Jannes H, Nolard N. 2004. Environmental investigations and molecular typing of *Aspergillus flavus* during an outbreak of postoperative infections. *J Hosp Infect* 57: 149–55.

Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D. 2002. Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B; Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global *Aspergillus* Study Group. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 347: 408-15.

Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campo Fs, Villard O, Liu KL, Natarajan-Ame´ S, Lutz P, Dufour P, Bergerat JP, Candolfi E. 2002. *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* 20: 1898-1906.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, *et al.* 2008. 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* 29: 996–1011.

Hollenbach E 2008. Invasive candidiasis in the ICU: evidence based and on the edge of evidence. *Mycoses* 51: 25-45.

Horvath JA, Dummer S. 1996. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 100: 171–178.

- Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Doma E 2003. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol and Immunol* 18: 302-308.
- Husain S, Kwak EJ, Obman A, Wagener MM, Kusne S, Stout JE, McCurry KR, Singh N. 2004. Prospective assessment of Platelia *Aspergillus* galactomannan antigen for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 4: 796–802.
- Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, Wheat JL, Johnson B, McLaughlin L, Bentsen C, McCurry KR, Singh N. 2007. *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation* 83: 1330–1336.
- Jantunen E, Salonen J, Juvonen E, Koivunen E, Siitonen T, Lehtinen T, Kuittinen O, Leppä S, Anttila VJ, Itälä M, Wiklund T, Remes K, T. Nousiainen T. 2004. Invasive fungal infections in autologous stem cell transplant recipients: a nation-wide study of 1188 transplanted patients. *Eur J Haematol* 73: 174–178.
- Jantunen E, Ruutu P, Niskanen L, Volin L, Parkkali T, Koukila-Kahkola P, Ruutu T 1997, Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogenic BMT recipients. *Bone Marrow Transp* 19: 801-808.
- Jayatilake JAMS, LP Samaranayake 2010. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses* 53: 285–295.
- Jayatilake JAMS 2011. A Review of the Ultrastructural Features of superficial candidiasis. *Mycopathologia* 171: 235–250.
- Jirí Pavlu, Richard M. Szydlo, John M. Goldman and Jane F. Apperley 2011. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood* 117: 755-763.
- Johnson LB, Kauffman CA. 2003. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 36: 630-637.

Junghanss C, Marr KA, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, McSweeney PA, Storb R. 2002. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant* 8: 512–520.

Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori S-I, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H 2001. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 33: 1504-1512.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-kozik M, Kozik A. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56: 211-224.

Keating GM, Figgitt DP 2003. Caspofungin. A review of its use in oesophageal candidiasis, invasive candidiasis and invasive aspergillosis. *Drugs* 63: 2235–2231.

Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Loebenberg D, Rinaldi MG, Patterson TF. 2000. Efficacy of SCH56592 in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 780–782.

Klepser ME, Hoffman HL, Evans EJ 2000. Novel triazole antiungal agents. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 539-605.

Kojima R, Kami M, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Miyakoshi S, Tajima K, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y. 2004. Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 10: 645-652.

Kontoyiannis DP, Bodey GP 2002. Invasive Aspergillosis in 2002: An Update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21: 161-172.

Krogh-Madsen M, Arendrup MC, Heslet L, Knudsen JD. 2006. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin Infect Dis* 42: 938-944.

Krishnan S, Elias KM, Pranatharthi HC 2008. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 52: 206–222.

Kumar CPG, Menon T, Rajasekaran S, Sekar B, Prabu D 2008. Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India. *Mycoses* 52: 44-54.

Kurtzman CP, Fell JW 1998. The Yeasts, A Taxonomic Study. *Fourth edition, Elsevier*.

Kwak EJ, Husain S, Obman A, Meinke L, Stout J, Kusne S, Wagener MM, Singh N 2004. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 42: 435–438.

Latge JP 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12: 310-350.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, Carlet J, Reynes J, Rosenheim M, Regnier B, Lortholary O 2009. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France. *Crit Care Med* 37: 1612-1618.

Loeffles J, Hebart H, Brauche U, Schumaker U, Einsele H 2000. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin. Microbiol* 38: 3830-3833.

Lu JJ, Lee SY, Chiueh TS 2004. *In vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida* blood isolates and avaluation of the E-test method. *J Microbiol Immunol Infect* 37: 335-342.

Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, Van Elder J, Verbist L, Boogaerts M 1999. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients as risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 37: 3223-3228.

Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M 2002. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 186: 1297–1306.

Maertens J, Glasmacher A, Selleslag D, Ngai A, Ryan D, Layton M, Taylor A, Sable C, Kartsonis N. 2005. Evaluation of serum sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for circulating galactomannan during caspofungin therapy: results from the caspofungin invasive aspergillosis study. *Clin Infect Dis* 41: 9–14.

Maertens JA, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M 2001. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 97: 1604-1610.

Maertens JA 2004. History of development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect Dis* 10: 1-10.

Manfredi M, McCullough MJ, Polonelli L, Conti S, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter SR 2006. *In vitro* antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiology Immunology* 21: 177-182.

Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L 2002. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 100: 4358-4366.

Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ 2004. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 190: 641–9.

Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W 2005. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 40: 1762–1769.

Marr KA, Bow E, Chiller T, Maschmeyer G, P Ribaud, Segal B, Steinbach W, Wingard JR, Nucci M 2009. Fungal infection prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 44: 483–487.

Martinez R 2006. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol* 32: 449-460.

Martino R, Subirá M, Rovira M, Solano C, Vázquez L, Sanz G, Urbano-Ispizua A, Brunet S, Cámara R 2002. Invasive fungal infections after allogenic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. *Brit J Haematol*. 116: 475-482.

Martino R, Piñana JL, Parody R, Valcarcel D, Sureda A, Brunet S, Briones J, Delgado J, Sánchez F, Rabella N, Sierra J 2009. Lower respiratory tract respiratory virus infections increase the risk of invasive aspergillosis after a reduced-intensity allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 44: 749–756.

McWhinney PHM, Kibbles CC, Hamon MD, Smith OP, Gandhi L, Berger A, Walesby RK, Hoffbrand AV, Prentice HG 1993. Progress in diagnosis and management of aspergilosis in bone marrow transplantation: thirteen years experience. *Clin Infect Dis* 17: 397-404.

Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE 2004. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 4: 349-357.

Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Oflazoglu, B, Inci R, Tumbay E 2011. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and Etest methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia* 172: 187-199.

Mikulska M, Raiola AM, Bruno B, Furfaro E, Van Lint MT, Bregante S, Ibatíci A, Del Bono V, Bacigalupo A, Viscoli C 2009. Risk factors for invasive aspergillosis and related mortality in recipients of allogeneic SCT from alternative donors: an analysis of 306 patients. *Bone Marrow Transplant* 44: 361–370.

Morgan J., K. A. Wannemuehler, K. A. Marr, S. Hadley, D. P. Kontoyiannis, T. J. Walsh, S. K. Fridkin, P. G. Pappas, Warnock D. W 2005. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol* 43: S49-S58.

Morrison VA, Haake RJ, Weisdorf DJ 1994. The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation. *Medicine* 72: 78-89.

Munoz P, Alcalá L, Sanchez CM, Palomo J, Yanez J, Pelaez T, Bouza E 2003. The isolation of *Aspergillus fumigatus* from respiratory tract specimens in heart transplant recipients is highly predictive of invasive aspergillosis. *Transplantation* 75: 326–329.

Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinsk TI, Azeredo J, Oliveira R 2010. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia*. 169: 175-182.

Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman R, Sutton DA, Rinaldi MG 1998. Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 177: 425-430.

Nucci M, Maiolino A 2000. Infecções em transplante de medula óssea. *Medicina*, Ribeirão Preto, 33: 278-293.

Nucci M, Anaissie E 2002. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 35: 909–920.

Nucci M 2003. Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and Zygomycetes in transplant recipients. *Cur Op Infect Dis* 16: 607-612.

Nucci M; Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, Voltarelli JC, Colombo AL, Imhof A, Pasquini R, Maiolino A, Souza CA, Anaissie E 2004. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 38: 1237-1242.

O'Donnell MR, Schmidt GM, Tegtmeyer BR, Faucett C, Fahey JL, Ito J, Nademance A, Niland J, Parker P, Smith EP, Snyder DS, Stein AS, Blume KG, Forman SJ 1994. Prediction of systemic fungal infection in allogeneic marrow recipients: impact of amphotericin prophylaxis in high-risk patients. *J Clin Oncol* 12: 827-834.

Odds FC, Gow NAR, Brown AJP 2006. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In molecular principles of fungal pathogenesis. Heitman J, Filler G, Edwards JE Jr, Mitchell AP. *ASM Press, Washington DC*. Eds, pp 305-319.

Ofelia C. Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R 2004. Guidelines for preventing health-care– associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep* 53: 1–36.

Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, Aloisi T, Irrera G, Bonini A, Picardi M, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Melillo L, Waure C, Reddicono G, Fianchi L, Valentini CG, Girmenia C, Leone G, Aversa F 2007. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study–Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis* 45:1161–1170.

Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N 2011. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 66: 5 –14.

Panizo MM, Reviaćkina V, Dolande M, Selgrad S 2009. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Med Mycol* 47:137–143.

Parody R, Martino R, Sanchez F, Subira M, Hidalgo A, Sierra J 2009. Predicting survival in adults with invasive aspergillosis during therapy for hematological malignancies or after hematopoietic stem cell transplantation: single-center analysis and validation of the Seattle, French, and Strasbourg prognostic indexes. *Am J Hematol* 84: 571–578.

Patterson TF 2005. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 366: 1013–1025.

Patterson JE 1999. Epidemiology of fungal infections in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* 1: 229-239.

- Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Piscitelli S, Candelario M, Field-Ridley A, Avila N, Bacher J, Walsh TJ 2001. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 857–869.
- Pfaller MA, Diekema DJ 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20:133-163.
- Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 42: 1417-1427.
- Playford EG, Marriott D, Nguyen Q 2008. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans *Candida* spp. *Crit Care Med* 36: 2034-2039.
- Reich G, Mapara MY, Reichardt P, Dorken B, Maschmeyer G 2001. Infectious complications after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: comparison between patients with lymphoma or multiple myeloma and patients with solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 27: 525–529.
- Richardson M, Lass-Flörl C 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 14: 5–24.
- Rieger CT, Rieger H, Kolb HJ, Peterson SH, Fiegl M, Ostermann H. 2009. Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: incidence in matched-related and matched-unrelated transplant settings. *Transpl Infect Dis* 11: 220-226.
- Rijnders BJ, Cornelissen JJ, L, MJ, JK, WCJ, EJ, B, A, Lugtenburg PJ, Marie S 2008. Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*. 46:1401–1408.
- Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BPK, Jayatilake JAMS, Yeung KWS, Yau JYY, Samaranayake LP 2006. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS* 114: 857-866.

- Sanguinetti M., Posteraro B, Pagano L, Pagliari G, Fianchi L, Mele L, Sorda ML, Franco A, Fadda G 2003. Comparison of Real-Time PCR, Conventional PCR, and Galactomannan Antigen Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Hematology Patients for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 41: 3922–3925.
- Segal BH, Kwon-Chung J, TJ, BS, Battiwalla M, NG, SM, Romani L 2006. Immunotherapy for fungal infections. *Clin Infect Dis* 42: 507–515.
- Schulster L, Chinn RY. 2003. Guidelines for environmental infection control in healthcare facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep* 52: 1–42.
- Seong Yeon Park , Sang-Oh Lee , Sang-Ho Choi , Heungsung Sung , Mi-Na Kim , Chang-Min Choi , Sang-Bum Hong , Yeon-Mok Oh , Tae Sun Shim , Younsuck Koh , Yang Soo Kim , Jun Hee Woo , Sung-Han Kim 2010. *Aspergillus* galactomannan antigen assay in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect* 61, 492-498.
- Shivaprakas MR, Geertsen E, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF 2010. *In vitro* susceptibility of 188 clinical and environmental isolates of *Aspergillus flavus* for the new triazole isavuconazole and seven other antifungal drug. *Mycoses* 54: 583-589.
- Siemann M, Koch-Dörfler M, Gaude M 1998. False-positive results in premature infants with the Platelia *Aspergillus* sandwich immunosorbent assay. *Mycoses* 41: 373–377.
- Silva MRR, de Paula CR, Silva SC, Costa TR, Costa MR 1998. Drug resistance of yeast isolated from oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. *Rev Microbiol* 29: 272-275.
- Silva P 2005. Drogas Antifúngicas. In: Farmacologia. *Guanabara Koogan, Rio de Janeiro*, 5ª ed,: 1081-1090.
- Singh N, Paterson DL 2005. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 18: 44–69.

Singh N, Husainb S, and the AST Infectious Diseases Community of Practice 2009. Invasive Aspergillosis in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant* 9: 180–191.

Staber P, Langner S, Dornbush HJ, Neumeister P 2007. Antifungal management in cancer patients. *Wien Med Wochenschr* 20: 503-510.

ST-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M, Lemieux C, Noël G 2001. Prevalence and Antifungal Susceptibility of 442 *Candida* Isolates from Blood and Other Normally Sterile Sites: Results of a 2-Year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 39: 949-953.

Telles Filho FQ, Severo LC 1997. Infecções causadas por fungos. In: Rodrigues AC (org.). Infecções hospitalares: prevenção e controle. *São Paulo: Sarvier*. p. 639-647.

Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, Wingard JR, Young JAH, Boeckh MJ 2009. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 1143–1238.

Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, Greinix H, Azevedo WM, Reddy V, Boparai N, Pedicone L, Patino H, Durrant S 2007. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 356: 335-347.

Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA 2007. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infec Dis* 44:531-540.

Van Burik JA, Carter SL, Freifeld AG, High KP, Godder KT, Papanicolaou GA, Mendizabal AM, Wagner JE, Yanovich S, Kernan NA 2007. Higher risk of cytomegalovirus and aspergillus infections in recipients of T cell-depleted unrelated bone marrow: analysis of infectious complications in patients treated with T cell depletion versus immunosuppressive therapy to prevent graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 1487–1498.

Vanden Bossche H 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 14: 44-49.

Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC 1994. Molecular mechanism of drugs resistance in fungi. *Trends Microbiol* 2: 393-400.

Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR 2000. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 38: 3595–3607.

Verweij, PE, Erjavec Z, Sluiter W, Goessens W, Rozenberg-Arska M, Debets-Ossenkopp Y, Guiot H, Meis J 1998. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra-and interlaboratory reproducibility. *J Clin Microbiol* 36: 1612–1616.

Verweij PE, Meis JF 2000. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transp Infect Dis* 2: 80-87.

Verweij PE, Mennink-Kersten MASH 2006. Issues with galactomannan testing. *Med Mycol* 44: 179–183.

Vonberg RP, Gastmeier P 2006. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 63: 246-254.

Wald A, Leisenring W, Van Burik JA, Bowden RA 1997. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 175: 1459-1466.

Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, Burik JV, Wingard JR, Patterson TF 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of Infections Diseases. Society of America. *Clin Infect Dis* 46: 327-360.

Williamson ECM, Millar MR, Steward CG, Cornish JM, Foot ABM, Oakhill A, Pamphilon DH, Reeves B, Caul EO, Warnock DW, Marks DI 1999. Infections in adults

undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *Brit J Haematol* 104: 560-568.

Wingard JR 1999. Opportunistic infections after blood and marrow transplantation. *Transpl Infect Dis* 1: 3-20.

Wingard JR, Velas SU, Santos GW, Merz WG, Saral R 1987. *Aspergillus* infections in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transp* 2: 175-181.

Winston DJ, Maziarz RT, Chandrasekar PH, Lazarus HM, Goldman M, Blumer JL, Leitz GJ, Territo MC 2003. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous and oral fluconazole for long-term antifungal prophylaxis in allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients. A multicenter, randomized trial. *Ann Intern Med* 138: 705-713.

Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, Kamberi P, Karashima R, Nagai H, Nasu M 1998. Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 36: 3619-3623.

Yeghen T, Kibbler CC, Prentice HG, Berger LA, Wallesby RK, McWhinney PH, Lampe FC, Gillespie S 2000. Management of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients: a review of 87 consecutive cases at a single institution. *Clin Infect Dis* 31: 859-868.

# ANEXOS

---

---

## Anexo 1: Formulário dos Pacientes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia - GO

CEP 74605-050 - Fone (062) 3209 - 6127 - FAX (062)3209 - 6363

### I. DADOS PESSOAIS

PACIENTE .....

PRONTUÁRIO..... LEITO.....

DATA DE NASCIMENTO ...../...../..... ESTADO CIVIL ..... SEXO .....

NATURALIDADE.....

ENDEREÇO.....

..... CIDADE..... ESTADO.....

TELEFONE .....

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS.....

.....

.....

DATA DA INTERNAÇÃO NO TMO: ...../...../.....

TIPO DE TRANSPLANTE .....

DATA DO TRANSPLANTE ...../...../.....

SAÍDA DO TMO ...../...../.....

OBS.: .....

MÉDICO RESPONSÁVEL PELO TMO:.....

### II. EQUIPAMENTOS INVASIVOS UTILIZADOS

	Data da Introdução	Data da Retirada
( ) Respirador	...../...../.....	...../...../.....
( ) Sonda nasogástrica	...../...../.....	...../...../.....
( ) Sonda nasoentérica	...../...../.....	...../...../.....
( ) Sonda vesical de demora	...../...../.....	...../...../.....
( ) Sonda vesical de alívio	...../...../.....	...../...../.....
( ) Cateteres	...../...../.....	...../...../.....
( ) Outros .....	...../...../.....	...../...../.....

III. HEMOGRAMA

Coleta	4° Coleta	1°Coleta	5° Coleta	2° Coleta	3°
Leucócitos	...../...../.....	...../...../.....	...../...../.....	...../...../.....	...../...../.....
...../...../.....					
1. Total	.....	.....	.....	.....	.....
2. Segmentados	.....	.....	.....	.....	.....
3. Bastonetes	.....	.....	.....	.....	.....
4. Eosinófilos	.....	.....	.....	.....	.....
5. Basófilos	.....	.....	.....	.....	.....
6. Linfócitos	.....	.....	.....	.....	.....
7. Monócitos	.....	.....	.....	.....	.....
8. LA	.....	.....	.....	.....	.....
PLAQUETAS	.....	.....	.....	.....	.....
HEMÁCIAS	.....	.....	.....	.....	.....

IV. QUADRO CLÍNICO

.....

.....

.....

VI. LABORATÓRIO

A. SANGUE PERIFÉRICO	Data	Resultado
1° Coleta	...../...../.....	.....
2° Coleta	...../...../.....	.....
3° Coleta	...../...../.....	.....
4° Coleta	...../...../.....	.....
5° Coleta	...../...../.....	.....
6° Coleta	...../...../.....	.....

B. SANGUE CATÉTER	Data	Resultado
1° Coleta	...../...../.....	.....
2° Coleta	...../...../.....	.....
3° Coleta	...../...../.....	.....
4° Coleta	...../...../.....	.....
5° Coleta	...../...../.....	.....
6° Coleta	...../...../.....	.....

C. OUTRAS AMOSTRAS:..... Data: ...../...../.....  
 RESULTADO: .....

Antibioticoterapia profilática	Profilaxia CMV	Antifúngico profilático
Ceftazidina	Acyclovir	Fluconazol
Amicacina	Gancyclovir	Itraconazol
Imipenem	Filtros	Cetoconazol
Vancomicina	Sangue se der CMV neg.	Anfotericina B

OBSERVAÇÕES DO PESQUISADOR .....

.....

.....

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL ..... DATA ...../...../.....

## **Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, na pesquisa intitulada **“CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA”**.

O documento sobre o trabalho a ser realizado será por mim lido e então você poderá aceitar fazer parte do estudo ou não. Se você aceitar, ira assinar ao final deste documento, que está em duas cópias, sendo que uma cópia será sua e a outra do pesquisador responsável. Se você recusar, não será prejudicado de forma alguma em seu tratamento. Além disso, se você aceitar participar e, depois se arrepender você poderá retirar seu consentimento sem prejuízo algum em seu tratamento. Caso você tenha alguma dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores, Milton Camplesi Junior nos telefones (62) 3255 96 05 ou 9607 35 72. Se você tiver alguma dúvida sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG, no telefone: (62) 3243 70 50.

### **INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ DEVE SABER SOBRE A PESQUISA**

Título: **“CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA”**.

### **INFORMAÇÃO SOBRE QUEM ESTA APLICANDO O TERMO DE CONSENTIMENTO:**

***PESQUISADORES PARTICIPANTES:*** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva - Investigadora responsável - Fone: 62 3209 61 27.

Milton Camplesi Junior – Biomédico / Pesquisador. Fones - (62) 32559605 ou 96073572

### **OBJETIVO DA PESQUISA**

A pesquisa terá como objetivo avaliar grupos de pacientes expostos ao transplante de medula óssea atendidos no Hospital Araújo Jorge para:

- a. Verificar quais são as principais micoses que ocorrem nos pacientes transplantados de medula óssea.
- b. Determinar os possíveis riscos envolvidos nestas micoses.
- c. Determinar qual o melhor medicamento a ser utilizado para combater esta micose.
- d. Determinar qual o diagnóstico é mais rápido para essas micoses

### **FORMA DE ACOMPANHAMENTO**

O material coletado de você irá ser encaminhado ao Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), onde será analisado para pesquisa de fungos. Os resultados serão fornecidos para seu médico para ajudar no seu tratamento.

### **ESPECIFICAÇÕES DOS RISCOS, PREJUÍZOS, DESCONFORTO, LESÕES QUE PODEM SER PROVOCADAS PELA PESQUISA.**

O material que será colhido em você, se for sangue, poderá ficar com uma pequena picadinha em seu braço ou um pequeno hematoma. Se o material for colhido em sua pele ou em outra superfície do seu corpo poderá ficar com uma mancha avermelhada, mas isto desaparecerá entre dois a três dias. Qualquer tratamento, o qual você estiver sendo submetido não será prejudicado com a coleta do material para exame da micose.

### **BENEFÍCIOS**

Você participando da nossa pesquisa poderá auxiliar nas descobertas sobre métodos de diagnóstico para micoses e assim o tratamento poderá ser melhorado

### **CONFIDENCIALIDADE**

Se você concordar em participar, as informações clínicas e laboratoriais sobre o material fornecido, por você, serão guardadas e mantidas sem que ninguém tome conhecimento do seu nome ou das iniciais do seu nome.

## **PARTICIPAÇÃO AUTORIZADA**

A participação deste estudo será uma decisão sua onde, você poderá aceitar ou recusar.

A sua participação será somente o fornecimento do material e **não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira para isso.**

## **PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO**

Neste estudo serão incluídos todos os pacientes (autorizados) que foram expostos ao transplante de medula óssea atendidos no Hospital Araújo Jorge.

### Anexo 3: Consentimento da participação da pessoa como sujeito da pesquisa

#### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ n°prontuário \_\_\_\_\_

abaixo assinado, concordo em participar do estudo “**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA**”, sob a responsabilidade da, Profª. Drª. Maria do Rosário Rodrigues Silva, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelos pesquisadores Milton Camplesi Junior sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável

Assinatura Dactiloscópica



Pesquisador Responsável:

\_\_\_\_\_  
Profª Drª Maria do Rosário Rodrigues Silva

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Milton Camplesi Junior

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores).

Nome \_\_\_\_\_

assinatura \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

assinatura \_\_\_\_\_

- Observações Complementares:
-

#### **Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Responsável Legal pelo Paciente Menor de Idade – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Solicitamos sua autorização para que o paciente sob sua representação legal possa participar como voluntário, na pesquisa intitulada **“CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA”**.

O documento sobre o trabalho a ser realizado será por mim lido e então você poderá responder se a pessoa por você responsável pode fazer parte do estudo ou não. Se você responder positivamente, irá assinar ao final deste documento, que está em duas cópias, sendo que uma cópia será sua e a outra do pesquisador responsável. Se você recusar, a pessoa sob sua responsabilidade não será prejudicado de forma alguma em seu tratamento. Além disso, se você aceitar e, depois se arrepender você poderá retirar seu consentimento sem prejuízo algum no tratamento dele (a). Caso você tenha alguma dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores, Milton Camplesi Junior nos telefones (62) 3255 96 05 ou 9607 35 72. Se você tiver alguma dúvida sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG, no telefone: (62) 3243 70 50.

#### **INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ DEVE SABER SOBRE A PESQUISA**

Título: **“CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA”**.

#### **INFORMAÇÃO SOBRE QUEM ESTA APLICANDO O TERMO DE CONSENTIMENTO:**

***PESQUISADORES PARTICIPANTES:*** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva - Investigadora responsável - Fone: 62 3209 61 27.

Milton Camplesi Junior – Biomédico / Pesquisador. Fones - (62) 32559605 ou 96073572

#### **OBJETIVO DA PESQUISA**

A pesquisa terá como objetivo avaliar grupos de pacientes expostos ao transplante de medula óssea atendidos no Hospital Araújo Jorge para:

- a. Verificar quais são as principais micoses que ocorrem nos pacientes transplantados de medula óssea.
- b. Determinar os possíveis riscos envolvidos nestas micoses.
- c. Determinar qual o melhor medicamento a ser utilizado para combater esta micose.
- d. Determinar qual o diagnóstico é mais rápido para essas micoses

### **FORMA DE ACOMPANHAMENTO**

O material coletado do paciente sob sua responsabilidade será encaminhado ao Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), onde será analisado para pesquisa de fungos. Os resultados serão fornecidos para seu médico para ajudar no seu tratamento.

### **ESPECIFICAÇÕES DOS RISCOS, PREJUÍZOS, DESCONFORTO, LESÕES QUE PODEM SER PROVOCADAS PELA PESQUISA.**

O material que será colhido do paciente sob sua responsabilidade, se for sangue, poderá deixar uma pequena picadinha no braço dele (a) ou um pequeno hematoma. Se o material for colhido da pele ou em outra superfície do corpo poderá deixar uma mancha avermelhada, mas isto desaparecerá entre dois a três dias. Qualquer tratamento, ao qual o paciente estiver sendo submetido não será prejudicado com a coleta do material para exame da micose.

### **BENEFÍCIOS**

O paciente sob sua responsabilidade participando da nossa pesquisa, poderá auxiliar nas descobertas sobre métodos de diagnóstico para micoses e assim o tratamento poderá ser melhorado.

### **CONFIDENCIALIDADE**

Se você autorizar que o paciente sob sua responsabilidade pode participar do estudo, as informações clínicas e laboratoriais sobre o material fornecido serão guardadas e mantidas sem que ninguém tome conhecimento do seu nome ou das iniciais do seu nome.

## **PARTICIPAÇÃO AUTORIZADA**

A participação deste estudo será uma decisão sua onde, você poderá aceitar ou recusar.

A participação do paciente será somente o fornecimento do material e **não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira para isso.**

## **PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO**

Neste estudo serão incluídos todos os pacientes (autorizado pelo seu representante legal) que foram expostos ao transplante de medula óssea atendidos no Hospital Araújo Jorge.

## **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA**

Eu, \_\_\_\_\_  
CPF: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ abaixo assinado,  
autorizo o paciente sob minha  
responsabilidade \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_  
RG: \_\_\_\_\_ n°prontuário \_\_\_\_\_ a participar do estudo  
**“CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE  
INFECÇÕES NOSOCOMIAIS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE  
MEDULA ÓSSEA”**, sob a responsabilidade da, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Rosário Rodrigues  
Silva, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelos  
pesquisadores Milton Camplesi Junior sobre a pesquisa, os procedimentos nela  
envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha  
autorização. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer  
momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do  
acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

Assinatura Dactiloscópica



Pesquisador Responsável:

---

Profª Drª Maria do Rosário Rodrigues Silva

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Milton Camplesi Junior

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores).

Nome \_\_\_\_\_

assinatura \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

assinatura \_\_\_\_\_

- Observações Complementares:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Anexo 5: Parecer do Comitê de Ética, TCLE

PROTOCOLO CEPACCG Nº 055/08

Goiânia, 03/11/2008

**INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva, Prof. Milton Camplesi Júnior e Bióloga Núbia Pontes Pereira.

**TÍTULO:** Caracterização e identificação de fungos causadores de infecções nosocomiais em pacientes transplantados de medula óssea.

**Área Temática:** Grupo III

**Área de Conhecimento:** Ciências Biológicas/Microbiologia

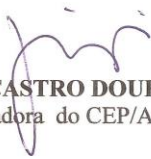
**Local de Realização:** Hospital Araújo Jorge/ACCG e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Todas as exigências deste CEP/ACCG foram atendidas pelos pesquisadores.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).

  
**DRA. JULIANA CASTRO DOURADO PINEZI**  
Coordenadora do CEP/ACCG



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

(62) 3878-7000 | 3243-7000  
Rua 239, nº 206, St. Universitário  
Goiânia · Goiás · Brasil · CEP 74.605-070  
[www.accg.org.br](http://www.accg.org.br)

## **Anexo 6: ARTIGO 1**

### **Detection of *Aspergillus galactomannan* and cultures in blood of hematopoietic stem cell transplant patients.**

**M. Camplesi Jr<sup>a</sup>, H.M. Silva<sup>b</sup>, C.R. Costa<sup>b</sup>, F.S. Ataiades<sup>b</sup>, L. K.H. Souza<sup>b</sup>, O.F.L. Fernandes<sup>b</sup>, M.R.R. Silva<sup>b\*</sup>**

a-Universidade Paulista-UNIP,

b-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás,  
Goiânia, GO, Brasil.

### **SUMMARY**

Invasive aspergillosis (IA) is the major cause of morbidity and mortality in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The galactomannan (GM), polysaccharide component of fungal cells, can be used in diagnostic assays. The purpose of this study was to verify the epidemiological characteristics, underlying disease, clinical outcomes and to evaluate the performance of GM antigen detection for the diagnosis of IA in HSCT recipients. The epidemiological and clinical data were collected from medical registries. Blood samples were obtained twice and analyzed by both galactomannan antigen assay and culture for detection of *Aspergillus* species. Among the 117 patients studied, 3 were classified as proven IA. Positive GM test results were verified in 9 cases (7.6%). By univariate analysis, it was found that proven and probable IA was associated with increased risk of death ( $P=0.003$ ). Statistical analysis demonstrated that age, sex, type of transplant and underlying disease were not independently associated with risk of death in IA patients. GM tests had a sensitivity of 90% and specificity of 85.8%. Considering that the crude mortality rate of IA is very high and the early therapy may lead to improved prognosis, we could suggest that the GM detection in serum of HSCT patients could be useful as screening tools for identification of IA.

---

*\*Corresponding author. Address: Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Setor Universitário, Goiânia-GO, Brasil. e-mail adress: [rosario@iptsp.ufg.br](mailto:rosario@iptsp.ufg.br) Tel. 055 62 32096127, Fax: 32096363.*

Keywords: *Aspergillus*, Invasive Aspergillosis, hematopoietic cell transplant, Galactomannan antigen serum.

## **Introduction.**

Fungal infections have substantially increased in number and severity over the last few decades, especially in immunocompromised patients and those hospitalized with serious underlying diseases.<sup>1,2,3</sup> Invasive aspergillosis (IA) is a major cause of morbidity and mortality in patients receiving intensive immunosuppressive therapy and those undergoing allogeneic hematopoietic stem cell or solid organ transplantation.<sup>3</sup> This fungal infection occurs in 8-15% of patients undergoing stem cell transplantation with mortality ranging from 30 to 70%.<sup>4,5</sup>

Diagnosis of IA remains a challenge because the conventional microbiological methods as culture of clinical samples, have low sensitivity.<sup>6</sup> The galactomannan (GM), polysaccharide component of fungal cells wall released during tissue invasion by *Aspergillus* hyphae in biological fluids can be used in diagnostic assays.<sup>7,8,9</sup> A serum enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) that employs the rat monoclonal antibody EB-A2 and recognizes the 1→5 β-D galactofuranoside side chains of the GM molecules, has been approved for IA diagnosis by US Food and Drugs Administration (FDA) and has also been considered enough promise.<sup>7</sup> According to Leeftang et al., 2008, this test has gained widespread acceptance as a sensitive method to undertake prospective surveillance in patients with risk for invasive aspergillosis.<sup>10</sup> So, analysis of the overall accuracy of the test for surveillance of IA in transplants recipients is of major importance.

The purpose of this study was to verify the epidemiological characteristics, underlying disease, clinical outcomes, and to evaluate the performance of GM antigen detection for the diagnosis of IA in HSCT recipients.

## **Methods**

### *Patients*

The study was conducted in HSCT recipients at the oncology service from Hospital Araújo Jorge of Goiânia-GO, from December 2008 to July 2011. This study population consisted of individuals with probability for pulmonary aspergillosis. The criteria for inclusion were neutrophil count >500 cell/mm<sup>3</sup> for > 10 days, with a

persistent fever, despite first-line antibiotic therapy. This study was approved by ethical committee from association combating cancer of Goiás State. All patients agreed to participate and gave written informed consent. The epidemiological and clinical data were collected from medical registries.

#### *Clinical samples processing*

##### Identification of specie

Cultures from blood for detection of fungal species was performed by using a biphasic bottle containing a slant of brain heart infusion agar and BHI broth. After inoculation of 5 ml of blood into the culture bottles, they were incubated in an upright position for 30 days at 25° C. Cultures were examined daily for visual evidence of growth, and each examination was followed by a gentle mixing of the blood-broth mixture over the agar slants. Visual growth was examined and subcultured onto Sabouraud dextrose agar slants media for identification.

*Aspergillus* species were identified on the basis of their macroscopical characteristics and morphologies of their conidiophores and conidia. To identify the specie, a slide culture method was used (microculture) in potato agar, incubated at 25°C for 5 days. Confirmation of fungi as etiologic agent was accomplished by reproducible growth from the blood samples at different times by repeated culture attempts.

#### *GM detection*

Regular monitoring of serum GM was performed at last twice in all patients who received HSCT. The GM assay was performed with the Platelia *Aspergillus* test (Bio-rad, Paris, France), according to the manufacturer's recommendation for testing serum samples. An optical density (OD) cutoff value of 0.5 ng/mL or greater was considered positive for GM in serum in two sequential samples.<sup>8</sup>

IA was defined according to revised consensus definitions of the European Organization of the Research and treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG).<sup>11</sup> Proven cases of IA was defined as growth of *Aspergillus* from blood, while in probable cases of IA we evidenced new lung infiltrates on high-resolution chest CT scans and detection of GM in serum with the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. In possible IA there was lung infiltrates but without microbiological evidence of disease and with negative GM test.

### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using SPSS software (version 16 for Windows). All variables were analyzed with logistic regression test. *P* values  $\leq 0.05$  were considered to have statistical significance

### **Results**

A total of 392 serum samples from 117 patients were studied in this work. The demographic characteristics, type of transplant, underlying disease of the patients and the occurrence of IA in these patients are outlined in Table 1. The mean age was 35.7 years but the largest number of patients belonged to age group between 21 and 60 years. Among all patients, 52.2% were male, 53% were allogeneic recipients and the leukemia (55.5%) was the most frequent underlying diseases. Among these patients, the overall mortality rate for transplant recipients with proven/probable IA was 60 % (6/10)

Among 117 patients we identified three (2.5%) with proven IA defined by growth of *Aspergillus* species onto BHI medium, seven (5.9%) as probable IA with detection of GM in blood and presence of lung infiltrates (Fig. 1). Possible IA was found in three (2.5%) patients with radiological findings suggestive of IA and negative GM. False positive GM results with no radiological signs were observed in 13 patients which other fungi were isolated (data not shown). Among the positive cultures, *A. fumigatus* was recovered in two patients and *A. flavus* in one (Table 2).

### *Statistical analysis and diagnostic performance of serum GM assay*

By logistic regression analysis, it was found that IA was associated with increased risk of death ( $P < 0.05$ ). Age, sex, type of hematopoietic cell transplant and underlying disease were not independently associated with risk of IA .

The performance of the GM test was evaluated with proven and probable IA. At the index cutoff value of  $\geq 0.5\text{ng/mL}$ , the Elisa tests had a sensitivity of 90% (9 of 10) and specificity of 85.8% (94/107).

### **Discussion**

The practice of hematopoietic stem cell transplantation has improved the likelihood of a given patient to develop an invasive fungal infection.<sup>12,13</sup> In the present study, *Aspergillus* infections was considered as proven/ probable by culture, GM

positive and lung infiltrates in 10 (8.5%) of 117 HSCT recipients. Several prior studies have demonstrated IA as a predictor of poor outcomes.<sup>14,15</sup> Among patients with positive GM, classified as proven/probable IA, we observed also a significant predictor of death by logistic regression analysis ( $P=0.003$ ). According to Fukuda et al., 2003, IA is associated with high morbidity and mortality rates, ranging from 30% to 70% in transplant recipients respectively.<sup>5</sup>

It is well known that both autologous and allogeneic HSCT recipients have risks for IA, but the allogeneic population is associated with graft-versus-host disease (GVHD) and have higher risk of IA.<sup>16</sup> According to Singh & Paterson 2005, IA occurred in 8-15% of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation.<sup>4</sup> Although 60% (6/10) of our allogeneics patients had IA, the logistic regression was not significant when compared with autologous patients (40%).

Diagnosis of IA is a challenge, because clinical and radiological signs are nonspecific, and the tissue biopsy is invasive and is not always possible as means of making diagnosis.<sup>8</sup> The incorporation of microbiological findings as culture may improve the diagnosis of IA, but this method could take a longer time and negative result may occur. The impact of early diagnosis leading to appropriate therapy may result in improved prognosis of patient.<sup>17</sup> In this way, the detection of galactomannan a component of *Aspergillus* sp cell wall in body fluids, hematogenously released during hyphal growth has become a useful aid in the diagnosis of IA.<sup>8</sup> The assay has gained widespread acceptance as a sensitive method undertake prospective surveillance in risk population.<sup>18</sup> The sensitivity found in our work of GM testing (at least two consecutive positive samples) was 90% (9 of 10) and specificity of 85.8% (94/107) when IA was defined by clinical characteristics and radiological findings suggestive of aspergilosis and positive culture for *Aspergillus* sp. The Platelia *Aspergillus* GM EIA was disappointment in the one case which culture was positive. Sensitivity of 61% and a specificity of 98% have been reported in HSCT recipients by Husain et al, 2007, while Pfeiffer et al., 2006, found sensibility of 82% and specificity of 86% in these patients.<sup>8,17</sup> A high specificity of 99.6% was found by Pinel et al, 2003 with galactomannan antigenemia positive in 748 of 773 patients.

Marr et al., 2005, suggest that antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay on serum samples.<sup>18</sup> Antifungal prophylaxis using fluconazole was performed for all our patients (data not shown). The false positive results found in our work are difficult to explain. However, some

researchers appoint that the use of drugs as antibiotics and airway colonization with *Aspergillus* species (or even laboratory contamination) could result GM positive.<sup>19,20</sup>

Considering that the crude mortality rate of IA is very high and the early therapy may lead to improved prognosis, we could suggest that the Platelia *Aspergillus* GM EIA in serum of patients could be useful as screening tools for identification in patients at high risk of developing IA

#### **Conflict of interest statement**

The present study has no conflict of interest

#### **Fundings**

We gratefully acknowledge Pfizer for supply the galactomannan kits

#### **References**

1. 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.
2. Bow EJ. Invasive fungal infection in haematopoietic stem cell transplant recipients: epidemiology from the transplant physician's viewpoint. *Mycopathologia* 2009; **168**: 283-97.
3. Fung JJ. Fungal infection in liver transplantation. *Transpl Infect Dis* 2002; **4**: 18-23.
4. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 44–69.
5. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2003; **102**: 827–33.
6. Morrison C, Warnock D. The role of radiology in the diagnosis of fungal infections. In: Maertens J, Marr K, editors. Diagnosis of fungal infection. *New York, NY: Informa Healthcare* 2007 p.65-119.

7. 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.
8. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 1417-27.
9. Klont RR, Mennink-kersten MA, Petraitine R et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J Infect Dis* 2004; **39**:1467-74.
10. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; **8**: CD007394.
11. Ascioğlu S, Rex H, de Pauw B, et al Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin InfectDis* 2012; **34**: 939-43
12. Baddley JW, Andes DR, Marr KA et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis* 2010; **50**: 1559–67.
13. BaddleyJW, Stroud PT, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Inf Dis* 2001; **32**: 1319-24
14. Parody R, Martino R, Sanchez F, Subira M, Hidalgo A, Sierra J. Predicting survival in adults with invasive aspergillosis during therapy for hematological malignancies or after hematopoietic stem cell transplanation: single-center analysis and validation of the Seattle, French, and Strasbourg prognostic indexes. *Am J Hematol* 2009; **84**: 571–78.
15. Barnes PD, Marr K A. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Brit J Haematol* 2007; **139**: 519-31.

16. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C *et al.*, *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients; *J Clin Oncol* 2002; **20**:1898-1906.
17. Husain S, Paterson DL, Studer SM, *et al.* *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation* 2007; **83**: 1330–36.
18. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 1762–69.
19. Ansorg R, Van der Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* 1997; **40**: 353–57.
20. 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**: 1297–1306.

**Table 1.** Analysis of characteristics and risk factors of 117 hematopoietic stem cell transplant patients for invasive aspergillosis (proven/probable).

Characteristics	Proven/probable IA			
	n	%	N	%
Age (mean=35.7)				
0 - 20 years	26	22.2	3	30
21 – 40 years	39	33.3	5	50
> 60 years	14	12.0	2	20
Gender				
Male sex	61	52.2	4	40
Female sex	56	47.8	6	60
Type of hematopoietic stem cell transplant				
Autologous	55	47.0	4	40
Allogeneic	62	53.0	6	60
Underlying disease				
AML	29	24.8	3	30
CML	12	10.2	2	20
ALL	24	20.5	2	20
LH	15	12.8	-	-
NHL	19	16.2	2	20
MM	14	12.0	1	10
AA	2	1.7	-	-
MDS	1	0.9	-	-
HPN	1	0.9	-	-

**NOTE.** AML-acute myeloid leukemia, CML-chronic myeloid leukemia, ALL- acute lymphoid leukemia, LH-Hodgkin's lymphoma, NHL non-Hodgkin lymphoma, MM-multiple myeloma, AA-aplastic anemia, MDS-myelodysplastic syndrome, HPN-paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

**Table 2.** Mycological findings and *Aspergillus* GM ELISA results among patients with invasive fungal infection after hematopoietic stem cell transplant

Isolate n°.	Proven/probable IA <sup>a</sup>	Culture result	GM	Outcome
1	Proven	<i>A. fumigatus</i>	Positive	Death
2	Proven	<i>A. fumigatus</i>	Positive	Death
3	Proven	<i>A. flavus</i>	Negative	Death
4	Probable	Negative	Positive	Death
5	Probable	Negative	Positive	Survival
6	Probable	Negative	Positive	Death
7	Probable	Negative	Positive	Survival
8	Probable	Negative	Positive	Survival
9	Probable	Negative	Positive	Survival
10	Probable	Negative	Positive	Death
11	Possible	Negative	Negative	Survival
12	Possible	Negative	Negative	Survival
13	Possible	Negative	Negative	Survival

GM positive → Optical density (OD) value of 0.5 ng/mL or greater in serum in two sequential samples.

<sup>a</sup> EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer.



Fig 1. Radiographics images of lung infiltrates evidenced in proven and probable cases of invasive *Aspergillosis*.

## Anexo 7: ARTIGO 2

### ***Acremonium strictum* infection in hematopoietic stem cell transplanted recipient treated successfully with voriconazole: Case Report**

Milton Camplesi Júnior,<sup>1</sup> Adriano Moraes Arantes,<sup>2</sup> Hildene Meneses Silva,<sup>3</sup> Carolina Rodrigues Costa,<sup>3</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Paulista-UNIP

<sup>2</sup>Hospital Araujo Jorge

<sup>3</sup>Universidade Federal de Goias-UFG

**Abstract** A case of *Acremonium strictum* fungemia with proven involvement of the lungs in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant is reported. A high-resolution computed tomography scan of the lungs showed nodules in both lungs. Multiple cultures of blood demonstrated narrow septate hyphae, cylindrical conidia and solitary tapering phialides and microconidia that remained grouped in slimy heads which were identified as *A. strictum*. Susceptibility testing of the clinical isolate was performed to four antifungal agents. Amphotericin B, fluconazole and itraconazole were found to be inactive in vitro against the isolate; however it was found to be sensitive to voriconazole. This last drug was initiated and a high-resolution computed tomography scan of the lungs was normal after 10 days. One year later, the patient was free of symptoms and her blood culture was negative for fungi. Then, voriconazole appears to be effective in treatment for life-threatening *A.strictum* infections.

**Keywords:** *Acremonium strictum*, hematopoietic stem cell transplant, voriconazole.

### **Introduction**

Invasive infections caused by opportunistic yeasts and molds are a significant cause of morbidity and mortality in severely immunocompromised hosts [1-3]. These infections have compromised the success of treatment in bone marrow transplant recipient [4, 5]. *Acremonium* spp, a saprophytic hyaline mold ubiquitous in the human environment have emerged as an opportunistic pathogen[6-12]. The optimal treatment

---

**M.R.R.Silva** ✉ Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Setor Universitário, Goiânia-GO, Brasil. e-mail: [rosario@iptsp.ufg.br](mailto:rosario@iptsp.ufg.br) Tel. 055 62 32096127, Fax: 32096363

strategy for this fungus has not yet been established. We herein reported a patient with acute myeloid leukemia who developed invasive *Acremonium strictum* infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a HLA-identical donor and determined the *in vitro* susceptibility of this fungus against four antifungal agents.

### **Case report**

A 28-year-old woman underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) from related donor for high-risk myeloid leukemia in its second complete remission. The conditioning regimen included busulphan (16mg/kg) and cyclophosphamide (120 mg/kg). For graft-versus-host-disease prophylaxis she received short course methotrexate and cyclosporine (CSP). On day zero, she received unmanipulated G-CSF (Cell Growth-Stimulating Factor) mobilized peripheral stem cells from her HLA-identical sister containing  $8.4 \times 10^6$  CD34+ cells/Kg. Infections prophylaxis included fluconazole, acyclovir and trimetoprim/sulphamethoxazole. By the fourth day after the transplant, she was in severe neutropenia ( $<0.1 \times 10^3$  neutrophils/ $\mu$ l) and became febrile. Antibiotic treatment (meropenem) was initiated for febrile neutropenia. Two days after, vancomycin was added due to severe oral mucositis and febrile new peak. Despite of febrile granulocytopenia no other complication was observed before engraftment. Neutrophils and platelets were engrafted on day +10 after HCT. On day 14 after HCT she again became febrile with mental confusion and chills and treatment with caspofungin was then started. A high-resolution computed tomography scan of the lungs showed nodules in both lungs.

Cultures on Sabouraud dextrose and brain-heart-infusion from the peripheral catheter and blood showed after 5 days, pale pink color colonies that became powdery on the seventh day of incubation at 25°C. Microscopy revealed narrow septate hyphae, cylindrical conidia and solitary tapering phialides and microconidia that remained grouped in slimy heads (Figure 1). Repeated cultures from clinical samples (blood and catheter) on Sabouraud dextrose agar presented similar macroscopic and microscopic characteristics identified as *Acremonium strictum*.

Susceptibility testing of the clinical isolate was performed in duplicate using a microdilution test and following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [13]. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the antifungals

tested were as follows: amphotericin B > 16µg/mL, itraconazole > 16µg/mL, fluconazole > 64µg/mL and voriconazole =0,125µg/mL.

After this, we initiated voriconazole instead of caspofungin, with a loading dose of intravenous 400 mg twice a day during 14 days followed by a maintenance dose of 200 mg twice a day during 2 weeks. A high-resolution computed tomography scan of the lungs was normal after 10 days of voriconazole. One year later, the patient was free of symptoms and her blood culture was negative for fungi.

### **Discussion**

*Acremonium* spp known to colonise skin, upper respiratory tract mucosa, sinuses and conjunctiva became an emerging nosocomial fungal pathogen with a few reported disseminated infections [7, 8, 12]. *Acremonium* infections are disseminated to numerous organs and tissues probably due to their in vivo sporulation and the production of hyphae, phialides and phialoconidia that are released into the bloodstream [8]. According to Schell and Perfect [14] the positivity of blood cultures is based in part upon the ability of sporulation of fungus in host tissue. Significantly, cultures (three) from blood samples were positive in different days. This dissemination of infection could indicate a particular virulence and resistance to treatment of this fungus.

Optimal treatment of *Acremonium* infections is not well-defined. In some reports, amphotericin B is considered effective in invasive infection [15], but in other reports clinical failure of therapy have been observed [16, 17]. Our patient appeared to be resistant to amphotericin B, with MIC > 16 µg/mL. Treatment with voriconazole have proved success in *Acremonium* fungaemia in immunocompromised patients [17]. Although standardization of methodology for susceptibility testing is still suboptimal, data in vitro have showed that newer azoles as voriconazole and posaconazole may be effective against *Acremonium* spp. In this case, *A. strictum* isolate was found to be resistant in vitro to three antifungals drugs (high MICs values) but low MICs were found to voriconazole and success was obtained after clinical treatment with this drug. Then, voriconazole appeared to be effective in patients receiving bone marrow transplant failing previous caspofungin treatment.

Early diagnostic procedures such as cultures, and in vitro susceptibility testing should be performed prior to starting antifungal treatment in order to improve the outcome of *Acremonium* infection in the immunocompromised hosts.

**Conflict of interest** None

## References

1. Das S, Saha R, Ahmad Dar S, Ramachandran VG. *Acremonium* species: A Review of the Etiological Agents of Emerging Hyalohyphomycosis. *Mycopathol.* 2010; 170:361-75.
2. Pagano L, Caira M, Candoni A, Posteraro B, Fianchi L. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematol.* 2006; 91:1068–75.
3. Pagano L, Caira M, Nosari A, et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:1161–70.
4. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:1813–21.
5. Pagano L, Caira M, Valentini GC, Posteraro B, Fianchi L. Current therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients. *Blood Rev.* 2010; 24:51–61.
6. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:909–17.
7. Miyakis S, Velegriaki A, Delikou S, et al. Invasive *Acremonium strictum* infection in a bone marrow transplant recipient. *The Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25:273-275.
8. Koç AN, Erdem F, Patiroğlu T. Case report. *Acremonium falciforme* fungemia in a patient with acute leukemia. *Mycoses.* 2002;45:202-3.
9. Guarro J, del Palacio A, Gené J, Cano J, González CG. A case of colonization of a prosthetic mitral valve by *Acremonium strictum*. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26:146-8.
10. Khan Z, Al-Obaid K, Ahmad S, Ghani AA, Joseph L, Chandy R. *Acremonium kiliense*: Reappraisal of Its Clinical Significance. *J. Clin Microbiol.* 2011;49:2342–7.
11. Durbec M, Bienvenub AL., Picot S, Dubreuil C, Cosmidis A, Tringali S. Maxillary sinus fungal infection by *Acremonium*. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011;128:41-3.

12. Beltrame L, Sarmati L, Cudillo R, et al. A fatal case of invasive fungal sinusitis by *Scopulariopsis acremonium* in a bone marrow transplant recipient. *Int J Infect Dis.* 2009; 13:488-92.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. M38-A2 CLSI.
14. Schell WA, Perfect JR. Fatal disseminated *Acremonium strictum* infection in a neutropenic host. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:1333-6.
15. Kendirli T, Ciftci E, Ekim M, et al. *Acremonium* spp. peritonitis in an infant. *Mycoses.* 2008; 51:455–7.
16. Foell JL, Fisher M, Seibold M, et al. Lethal Double infection with *Acremonium strictum* and *Aspergillus fumigatus* during induction chemotherapy in a child with ALL. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 49:858-61.
17. Mattei D, Mordini N, Lo Nigro C, et al. Successful treatment of *Acremonium* fungemia with voriconazole. *Mycoses.* 2003; 46:511-4.

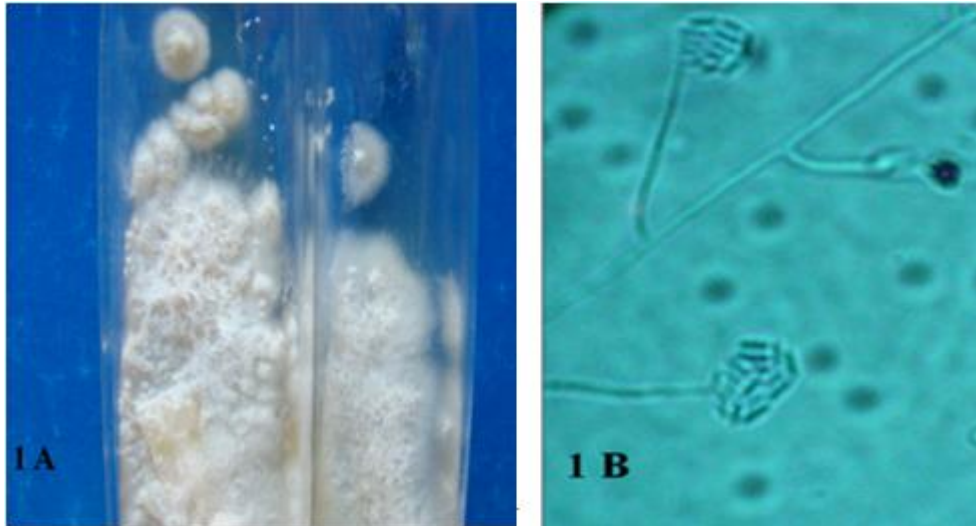


Figure 1- *Acremonium strictum*. 1A - Colonies pale pink color, powdery incubated at 25°C. 1B - Solitary tapering phialides and microconidia grouped in slimy heads, 400X