

# Diagnóstico da aspergilose invasiva: Aplicação das Técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Ensaio Imunoenzimático de Detecção da Galactomanana (EIA-GM®)

## *Diagnosis of invasive aspergillosis: Application of Polymerase Chain Reaction Techniques (PCR) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Galactomannan (EIA-GM®)*

Alisson Brandão Ferreira<sup>1</sup>, Claudia Barbosa Assunção<sup>2</sup>, Thamara Tháscila Silva Silveira<sup>2</sup>, Raquel Acaiah<sup>2</sup>, Antônio Tarcísio Faria Freire<sup>3</sup>, Jorge Luiz Saliba<sup>3</sup>, Sônia Maria de Figueiredo<sup>4</sup>, Fabiana Rocha-Silva<sup>5</sup>, Rachel Basques Caligorne<sup>6</sup>

DOI: 10.5935/2238-3182.20150076

### RESUMO

**Introdução:** a aspergilose invasiva (IA) é uma infecção fúngica grave causada por espécies do gênero *Aspergillus* e acomete principalmente pacientes leucêmicos, diabéticos e aqueles receptores de transplante de células-tronco, que apresentem neutropenia. Os esporos dos fungos que colonizam o epitélio pulmonar podem invadir as células endoteliais de revestimento e o acesso vascular e, assim, disseminar-se para outros órgãos através do sangue. A elevada mortalidade da doença está relacionada à imunossupressão grave, à rápida progressão da infecção e, principalmente, à ausência de um diagnóstico precoce e eficiente. Portanto, o diagnóstico na fase inicial da infecção é adequado, proporcionando uma terapia mais eficaz, o que pode reduzir a taxa de mortalidade da doença. **Objetivo:** o presente estudo teve em vista avaliar a aplicabilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) no auxílio do diagnóstico de AI, em comparação com os resultados gerados pelo ensaio imunoenzimático de galactomanana (EIA-GM®), este já validado comercialmente. **Métodos:** foram analisadas 245 amostras de pacientes tratados no hospital Santa Casa de Belo Horizonte. Entre essas amostras, 16% (N = 39) foram positivos nos testes EIA-GM®. Em seguida, essas 39 amostras positivas foram analisadas pela técnica de PCR. **Resultados:** de acordo com os resultados, a técnica de PCR apresentou taxa de 97,44% de sensibilidade, 97,96% de acurácia e 100% de especificidade, quando comparada ao método EIA-GM®. **Conclusão:** a técnica de PCR pode auxiliar no diagnóstico da AI, sempre associando os seus resultados à clínica do paciente e aos testes de imunoenaios.

**Palavras-chave:** Aspergilose Pulmonar Invasiva/diagnóstico; *Aspergillus*; Técnicas Imunoenzimáticas; Reação em Cadeia da Polimerase.

### ABSTRACT

**Introduction:** invasive aspergillosis (AI) is a serious fungal infection caused by species of the genus *Aspergillus* that primarily affects leukemic and diabetic patients and those recipients of stem cell transplants, which have neutropenia. The fungi spores that colonize the lung epithelium may invade the endothelial cell lining and vascular access and thus, spread to other organs through the blood. The high mortality of the disease is related to severe immunosuppression, rapid infection progression, and especially lack of an early and efficient diagnosis. Therefore, the diagnosis in the initial infection phase is beneficial, providing a more effective therapy that can reduce the disease's mortality rate. **Objective:** this study aimed at evaluating the applicability of the polymerase chain reaction (PCR)

Recebido em: 16/03/2015  
Aprovado em: 16/06/2015

Instituição:  
Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa da  
Santa Casa de Belo Horizonte  
Belo Horizonte, MG – Brasil

Autor correspondente:  
Rachel Basques Caligorne  
E-mail: rachelbc@santacasabh.org.br

*in assisting the diagnosis of AI compared to the results generated by galactomannan enzyme immunoassay (EIA-GM®) that is already commercially validated.*

*Methods: 245 samples from patients treated in the Santa Casa de Belo Horizonte hospital were analyzed. Among these samples, 16% (N = 39) were positive in EIA-GM® tests. Subsequently, these 39 positive samples were analyzed by PCR. Results: According to the results, the PCR technique showed 97.44% sensitivity, 97.96% accuracy, and 100% specificity compared to EIA-GM®. Conclusion: the PCR technique may aid in the diagnosis of AI, always associating the results to the patient's clinical and immunoassay tests.*

*Key words: Invasive Pulmonary Aspergillosis; Aspergillus; Immunoenzyme Techniques; Polymerase Chain Reaction.*

## INTRODUÇÃO

A aspergilose invasiva (AI) é causada por espécies de fungos filamentosos, do gênero *Aspergillus*. A infecção se dá pela inalação de conídios que se alojam no pulmão, podendo invadir o revestimento de células endoteliais e disseminar-se para outros órgãos através da corrente sanguínea.<sup>1</sup>

De acordo com alguns estudos já publicados, a taxa de mortalidade da doença variou de 40 a 90%.<sup>1,6</sup> Essas variações podem ocorrer devido ao regime de tratamento aplicado e a alguns fatores de interação entre o hospedeiro e o fungo, tais como o estado imunológico do paciente, a virulência da cepa infectante e aos processos que contribuem para a patogênese da doença.<sup>1,6</sup> A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) avançada, assim como o uso prolongado de corticosteroides, também está associada ao alto risco de AI.<sup>7,8</sup>

Os pacientes pediátricos que apresentam câncer, particularmente aqueles com malignidades hematológicas, têm alto risco de desenvolver a AI. Nesses pacientes, a taxa de mortalidade é de 80 a 90%.<sup>2</sup>

A alta taxa de mortalidade da AI também está relacionada às dificuldades de se obter um diagnóstico precoce da doença.<sup>9,10</sup> O diagnóstico tem sido raramente estabelecido durante a fase inicial da infecção, em que o paciente tem baixa carga fúngica e quando a terapia seria mais eficaz.<sup>5</sup> Diversos estudos têm advertido que a sobrevivência pode ser aumentada por diagnóstico precoce, seguido de tratamento imediato.<sup>3,10,11</sup>

Considerando-se a falta de certeza do diagnóstico e a alta taxa de mortalidade associada à doença, o emprego da terapia antifúngica empírica tem sido defendido, em particular, para pacientes neutropênicos, que manifestam febre e que não respondem aos antimicrobianos de amplo espectro.<sup>3,9,10,12</sup> No entanto,

essa recomendação ainda não é seguramente validada e, quase inevitavelmente, resultam em tratamento excessivo, toxicidade, custos adicionais e alterações da ecologia microbiana.<sup>3</sup>

Desenvolver novos métodos que auxiliem no diagnóstico da AI se faz necessário, pois os métodos micológicos tradicionais, como a cultura e a identificação microscópica das espécies fúngicas, costumam ser demorados.<sup>2,5</sup> A obtenção de material de amostra utilizando procedimentos invasivos pode ser difícil, principalmente em pacientes pediátricos e, ainda, a cultura de sangue não é útil para detecção de *Aspergillus* spp.<sup>2,5</sup> Dessa forma, o diagnóstico pode ser aprimorado a partir da detecção do açúcar galactomanana (GM) na circulação sanguínea do paciente.<sup>2,5,13</sup>

O ensaio imunoenzimático de detecção de galactomanana (EIA-GM®), um polissacarídeo da parede celular de *Aspergillus* que pode estar presente no soro e em outros fluidos biológicos do paciente com AI, tem excelente valor preditivo negativo e é capaz de excluir essa doença com alta probabilidade.<sup>9,10</sup> Sua alta sensibilidade possibilita que o diagnóstico da doença possa ser definido antes mesmo que ela se manifeste clinicamente.<sup>5,6</sup>

O EIA-GM® (*Platelia*®*Aspergillus*, Bio-Rad Laboratories, França) é um teste já comercializado e tem sido amplamente utilizado em todo o mundo como diagnóstico preditivo de AI em pacientes imunocomprometidos.<sup>12,14,15</sup> Estudo demonstrou sensibilidade de 65,7% e intervalo de confiança de 95% e concluiu que a GM na circulação é preditiva de AI na maioria dos pacientes oncológicos pediátricos e que o teste de GM antigenemia pode preceder a evidência clínica, microbiológica ou radiográfica de AI.<sup>13</sup>

Na Europa, o teste foi introduzido na década de 1990 e a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou nos EUA em 2003.<sup>12</sup> O teste é realizado em etapas sequenciais, podendo ser finalizado em cerca de quatro horas, fornecendo um resultado numérico que pode ser agrupado em negativo ou positivo. A amostragem em série deve ser realizada pelo menos duas vezes por semana, enquanto os riscos persistirem.<sup>2,14-19</sup>

As técnicas de biologia molecular também têm grande potencial no auxílio de diagnóstico da AI. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de diagnóstico alternativo, pouco invasivo e tem sido cada vez mais utilizada no diagnóstico de micoses sistêmicas.<sup>20</sup> Esse método é uma importante ferramenta, uma vez que pode detectar o DNA circulante do agente causal quando em níveis baixíssimos, chegan-

do a picogramas/mL de DNA em amostra clínica.<sup>20,21</sup> Estudos que demonstram a viabilidade da PCR para o diagnóstico de AI por detecção de DNA do *Aspergillus* no sangue têm demonstrado sensibilidade de 36 a 98% e especificidade de 72 a 100%.<sup>22,23</sup> Em outras pesquisas, a PCR demonstrou-se menos sensível que a detecção EIA-GM<sup>®</sup>, 45 versus 93%, respectivamente,<sup>18,24-26</sup> sugerindo a combinação desses dois testes (EIA-GM<sup>®</sup> e PCR) para alcançar um diagnóstico rápido em pacientes neutropênicos, imunossuprimidos.<sup>2</sup>

O presente trabalho teve como meta avaliar a aplicação da técnica de PCR como auxílio no diagnóstico da AI, comparando os seus resultados com o imunoenzimático EIA-GM<sup>®</sup>, que já é um teste validado comercialmente e amplamente utilizado.

## METODOLOGIA

### Amostras biológicas

Foram coletadas 245 amostras de sangue periférico de pacientes com suspeita de AI, atendidos no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (HSCMBH), durante os meses de março de 2012 a março de 2014.

Todas as amostras foram analisadas pelo método de ensaio imunoenzimático de detecção de galactomanana EIA-GM<sup>®</sup> e, em seguida, as amostras positivas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HSCMBH (protocolo: 099/2011).

### *Platelia Aspergillus* imunoensaio (EIA-GM<sup>®</sup>)

Foi utilizado o *kit* EIA-GM<sup>®</sup> para a detecção de GM circulante no sangue do paciente e o método foi realizado de acordo com o manual nele contido.

### Extração de DNA de sangue total

As amostras positivas para o teste *PlateliaAspergillus* imunoensaios foram analisadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de se comparar os resultados entre as duas técnicas. Para tal, o DNA foi extraído de sangue total dos pacientes, utilizando o *kit* Invitrogen (EUA), conforme o manual contido no mesmo.

Depois de extraído e purificado, o DNA foi dosado por espectrofotometria utilizando o aparelho Nanovue Plus (GE *Healthcare Life Sciences*, Suécia) e, independentemente da concentração do DNA purificado, todas as amostras foram diluídas 10 vezes em água ultrapura esterilizada, antes de serem utilizadas nas PCRs.

A fim de detectar possíveis reações cruzadas com as regiões do DNA humano, foi incluído no estudo um grupo-controle negativo, composto de cinco amostras de sangue de pacientes negativos para a AI.

### Nested-PCR

O DNA extraído de sangue total foi submetido à Nested-PCR, que consiste em uma PCR que se realiza em dois passos, aumentando, assim, a quantidade do produto amplificado e, com isso, a sua melhor visualização em gel de eletroforese. Foram utilizados iniciadores direcionados para a região conservada do 18S rDNA de fungos dimórficos, sendo eles: o iniciador senso V9G(5'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3') e o antissenso LS266 (5'gCATTCCCAAACAACACTgACTC-3').<sup>27</sup> Os controles positivos e negativos foram incluídos em todas as PCRs realizadas. Foram utilizadas como controle positivo da reação duas amostras: uma de DNA de cultura de *Aspergillusniger* e uma de *Aspergillusfumigatus*, provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Micologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Os tubos contendo apenas água ultrapura esterilizada em vez de amostras de DNA foram usados como controle negativo nas PCRs.

O produto final da amplificação pelo primeiro passo da PCR (PCR-out), que gerou um fragmento de 800 pares de bases (pB), foi analisado em gel de poliacrilamida a 7% e corado por nitrato de prata a 2%. Para todos os ensaios de PCR foram utilizados iniciadores específicos para o gene de *globina-β constitutiva*, como um controle de qualidade da reação. Para cada PCR, foram utilizados os seguintes reagentes: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs; 0,6 mM de cada iniciador (Sigma, USA); 1 UI *Taq* DNA polymerase *Platinum* e tampão específico da PCR (Invitrogen, USA); 20 ng de DNA. O programa foi usado da seguinte maneira: primeiro passo – cinco minutos 94°C; segundo passo – 30 segundos 60°C; terceiro passo – 30 segundos 72°C; quarto passo – 30 segundos 94°C, vá para o segundo passo para 40 vezes e, finalmente, último passo: sete minutos 72°C.

Em seguida, foi realizado o segundo passo da PCR (PCR-in), que utiliza o produto amplificado pela primeira reação. Para esta etapa todos os produtos amplifi-

cados das amostras e controles foram diluídos 1:10 e o volume de 1 µL ou 2 µL foi adicionado à PCR, como descrito anteriormente. Os iniciadores utilizados foram os iniciadores senso: ITS1 (5'-TCCgTAggTgAACCTgCgg-3') e antissenso: ITS4 (5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC-3').<sup>27</sup>

Esses iniciadores amplificam uma região já amplificada anteriormente na PCR-in, possibilitando melhor visualização das bandas. O produto final, um fragmento de aproximadamente 600 pB, foi observado em gel de poliacrilamida a 7%, corado por nitrato de prata a 2% (Tabela 1). Para cada gel foi aplicado o marcador de peso molecular "100 pB" (marca Ludwig, Brasil), sempre na primeira canaleta. Em seguida, foi aplicada a mistura de 5 µL de amostra e 5 µL de corante tampão de amostra (Promega, USA).

**Tabela 1** - Principais dados epidemiológicos apurados

Dados epidemiológicos apurados	
Amostras analisadas (unidades)	26
Masculino (%)	49,00%
Feminino (%)	51,00%
Taxa de mortalidade apurada (%)	30,00%
Idade média (anos)	38
Tempo médio de internação (meses)	2
Cor prevalente (conforme classificação do HSCMBH)	Parda
Doença de base prevalente (CID-10)	C920
Média de antimicrobianos utilizados no período de internação	8
Utilização de Voriconazol injetável e/ou comprimido (%)	35,90%
Utilização de Amoxicilina/Clavulanato e/ou Piperacilina/Tazobactam – injetáveis (%)	15,40%

CID: Classificação Internacional de Doenças; CID C920: leucemia mieloide aguda.

## RESULTADOS

No período de março de 2012 a março de 2014 foram analisadas amostras de 245 pacientes atendidos nos serviços da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, entre estes, 16% (N=39) foram positivos no ensaio imunoenzimático (EIA-GM<sup>®</sup>).

Os dados epidemiológicos e sobre a utilização de antimicrobianos desses pacientes positivos, contidos no sistema informatizado do hospital, foram fornecidos pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), sendo que 33,3% (N=13) não foram localizados. Dessa forma, a análise epidemiológica, compilada na Tabela 1, foi realizada em apenas 26 pacientes.

Para a comparação entre os resultados gerados pela PCR e o ensaio imunoenzimático (EIA-GM<sup>®</sup>), foi

realizada uma prova diagnóstica ou de triagem, utilizando o programa *Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*<sup>®</sup>, disponível no site <http://www.openepi.com>, a fim de se estabelecer os índices de sensibilidade, especificidade e acurácia (precisão) da técnica de Nested-PCR, comparada ao teste de detecção de EIA-GM<sup>®</sup>.

A sensibilidade da *Nested-PCR* calculada foi de 97,44%, com precisão de 97,96 e 100% de especificidade (Tabela 2).

**Tabela 2** - Análise do desempenho do teste *Nested-PCR* comparada ao teste imunoenzimático EIA-GM<sup>®</sup>, utilizando o programa *Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*<sup>®</sup> (<http://www.openepi.com>)

Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health	Teste de detecção de GM Platellia			
	Positivo	Negativo		
Nested-PCR	Positivo	38	0	
	Negativo	1	5	
Total		39	5	
Especificidade	Sensibilidade	Acurácia	VPP	VPN
100%	97,44%	97,73%	100%	83,33%

## DISCUSSÃO

De acordo com as análises dos prontuários, observou-se que a maioria dos pacientes era do sexo feminino (51,0%), com média de idade de 38 anos. Em relação à cor, a maioria era parda e a doença de base predominante foi a leucemia mieloide aguda.

O doente leucêmico já apresenta quadro de imunossupressão e, ao ser hospitalizado, é ainda exposto a agentes patógenos, seja pelo ambiente hospitalar ou pelas próprias práticas terapêuticas, imprescindíveis para sua recuperação, como, por exemplo, a utilização de um acesso venoso para administração dos fármacos. Sendo assim, o doente está sob alto risco de contrair AI e cerca de 80% dos pacientes com leucemia manifestam complicações infecciosas em algum ponto durante o curso da doença.<sup>28</sup> Dessa forma, torna-se importante adotar medidas preventivas, com o diagnóstico precoce da AI nesses pacientes.

Quanto à permanência hospitalar, observou-se que o tempo médio de internação foi de dois meses. A propósito do tratamento terapêutico utilizado pelos pacientes hospitalizados com leucemia, nove (35%) utilizavam voriconazol injetável e/ou comprimido como tratamento base desse tipo de neo-



plasia. Apenas quatro pacientes (15,4%) utilizavam amoxicilina/clavulanato e/ou piperacilina/tazobactam – injetáveis. Outros 13 (50%) se submeteram outro tratamento terapêutico.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a técnica de *Nested*-PCR apresentou taxa de 97,44% de sensibilidade, 97,96% de acurácia e 100% de especificidade, quando comparada ao método EIA-GM®.

Em estudo realizado por Martín-Rabadán *et al.*<sup>4</sup>, o teste de galactomanana EIA-GM® apresentou sensibilidade de 78% (61-89%) e especificidade de 81% (72-88%), utilizando um índice de densidade óptica de GM (GMI) de 0,5 ng/mL como ponto de corte.<sup>4</sup> Dessa forma, fica demonstrando que a triagem no sangue do genoma do *Aspergillus* spp, pelo ensaio *Nested*-PCR, pode ser mais sensível, auxiliando no diagnóstico precoce da AI em pacientes com suspeita de AI. No presente estudo, os iniciadores (*primers*) empregados nas PCRs foram específicos para o gênero *Aspergillus*, o que torna a técnica altamente específica. Porém, o valor de diagnóstico baseado somente nos resultados gerados pela técnica de PCR ainda é um tema em debate.

Ainda de acordo com Martín-Rabadán *et al.*<sup>4</sup>, as situações de falso-positivo para o teste de galactomanana, EIA-GM®, podem ser classificadas em quatro grupos:

- reação cruzada com infecção por outros fungos;
- administração intravenosa de produtos derivados de fungos como antibióticos betalactâmicos ou gluconato presente em soluções de eletrólitos para hidratação;
- descuido com as amostras no laboratório pós-extração;
- absorção entérica de substância contendo GM ou antígenos bacterianos (estes têm sido propostos, mas não comprovados).

Além disso, diferentes estudos demonstram que também podem ocorrer resultados falso-positivos em pacientes acometidos por outras micoses sistêmicas, pois o epitopo detectado pelo anticorpo monoclonal utilizado no teste *Platelia* EIA-GM® está contido também em outros antígenos e em algumas espécies fúngicas semelhantes, sendo elas:

- gêneros: *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Trychophyton*, *Botrytis*, *Wallemia*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Trichothecium*, *Myceliophthora*, *Blastomyces* e *Fusarium* infecções causadas por *Neosartoria*;<sup>4,16,17,23,29-31</sup>
- espécies: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryp-*

*tococcus gattii*, *Geotrichum capitatum*, *Penicillium marneffeii*.<sup>15,29</sup>

A alta taxa de mortalidade da doença em populações de alto risco reflete, em parte, a dificuldade de se estabelecer diagnóstico confiável no início da doença, sendo a identificação rápida e precisa necessária para o manejo clínico bem-sucedido da infecção.<sup>3,11</sup> No presente estudo, encontrou-se taxa de mortalidade de 30% entre os pacientes positivos para EIA-GM, portadores de AI, atendidos no Hospital Santa Casa de Belo Horizonte. Devido à baixa taxa de mortalidade entre os pacientes portadores de AI nesse hospital, quando comparada aos demais estudos já publicados até o momento, pode-se inferir a importância da estruturação dos serviços hospitalares públicos e privados para a medida sequencial dos níveis séricos da galactomanana e os benefícios clínicos para os pacientes com a realização do diagnóstico provável precoce para AI. A análise dos dados coletados reforça os achados por outros autores, sugerindo que a triagem prospectiva para a GM pode preceder a evidência clínica, microbiológica ou radiográfica de AI, permitindo, assim, o diagnóstico precoce entre oito e nove dias.<sup>3,13,14</sup>

A possibilidade de detectar com rapidez o antígeno GM nos soros dos pacientes ou de detectar o genoma do fungo no sangue periférico total é de grande importância no diagnóstico precoce e rápido da AI e, portanto, para a eficaz intervenção terapêutica. Entretanto, os resultados gerados por esses marcadores precisam estar associados aos parâmetros laboratoriais e clínicos.

Os resultados da *Nested*-PCR são significativos e indicam um caminho para a utilização rotineira da técnica. Contudo, são necessários maiores estudos utilizando um número amostral mais representativo da população de prevalência/incidência, para a validação desse método como diagnóstico efetivo, assim como testar a sua reprodutibilidade. Embora possa ser considerada uma amostra relativamente pequena, o presente estudo apresentou resultados relevantes e concordantes com outros já publicados, evidenciando que essa técnica pode contribuir para a tomada de decisões do corpo clínico perante a situação atual da AI.<sup>30,32</sup>

Novaretti *et al.*<sup>31</sup> também demonstram que o teste de PCR-*Nested* tem considerável potencial clínico para o diagnóstico precoce de AI. Esta pesquisa teve como objetivo padronizar a *Nested*-PCR para detecção de *Aspergillus* spp em 23 indivíduos hemato-oncológicos.

Dos indivíduos avaliados, seis (21,7%) apresentaram resultados de *Nested-PCR* positivos para *Aspergillus*, cinco deles com comprometimento pulmonar. Numa das amostras com resultado positivo no PCR, não pôde ser observada evidência clínica de infecção por *Aspergillus*. A sensibilidade e especificidade desse teste foram de 100 e 94,4%, respectivamente.

A *Nested-PCR* tem confirmado ser uma ferramenta de diagnóstico muito sensível para a detecção de microrganismos em diversas amostras biológicas, incluindo os fungos, uma vez que o uso de duas etapas na PCR aumenta a sensibilidade do método. Entretanto, tem a limitação de facilitar a ocorrência de uma possível contaminação com conídios ubíquos ou co-amplificação com DNA humano, pois aumenta também a probabilidade de contaminação com outros genomas. Por isso, é imprescindível testar controles negativos (DNA humano e água ultrapura) em cada PCR, assim como foi executado neste trabalho.<sup>33</sup>

Este estudo contribui para o esclarecimento da situação da aspergilose invasiva, que vem preocupando médicos e cientistas, inclusive dos países desenvolvidos, que mesmo com tantos avanços na Medicina têm se deparado com a problemática das micoses sistêmicas. A aplicação desta pesquisa proporcionará avanços no diagnóstico e tratamento das micoses sistêmicas tanto nos serviços públicos quanto privados de saúde.

## AGRADECIMENTO

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Os autores não têm qualquer conflito de interesses a declarar.

## REFERÊNCIAS

- Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009 July; 22(3):447-65.
- Badie P, Alborzi A, Karimi M, Pourabbas B, Haddadi P, Mardaneh J, Moieni M. Diagnostic potential of nested PCR, galactomannan EIA, and Beta-D-glucan for invasive aspergillosis in pediatric patients. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6(4):352-7.
- Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 2002; 186:1297-306.
- Martín-Rabadán P, Gijón P, Fernández RA, Ballesteros M, Anguita J, Bouza E. False-positive *Aspergillus* Antigenemia Due to Blood Product Conditioning Fluids. *Clin Infect Dis.* 2012; 55(4):22-7.
- Sav H, Atalay MA, Demir G, Ozdemir MA, Koc AN. Diagnosi tempestiva di aspergillosi cerebrale effettuata con metodi differenti: caso clinico. *Infezioni Med.* 2013; 2:134-8.
- Tănase AD, Colită A, Mărculescu A, Berteanu C, Cercel AS, Stoica M, et al. Using the galactomannan antigen assay in the diagnosis of invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53(2):379-82.
- Ader F. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: An emerging disease. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 12:409-16.
- Gao X, Chen L, Hu G, Mei H. Invasive pulmonary aspergillosis in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and the diagnostic value of combined serological tests. *Ann Saudi Med.* 2010; 30(3):193-7.
- Penack O, Rempf P, Graf B, Blau IW, Thiel E. *Aspergillus* galactomannan testing in patients with long-term neutropenia: implications for clinical management. *Ann Oncol.* 2008; 19(5):984-9.
- Rácil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, Winterová J, Mayer J. Contribution of galactomannan antigen detection to early diagnosis of invasive aspergillosis. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2007; 13(5):176-83.
- Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, Paulf M. Diagnostic Accuracy of PCR Alone Compared to Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis: a Systematic Review. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(11):3652-8.
- Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2004 June; 4(6):349-57.
- Hayden R, Pounds S, Knapp K, Petraitiene R, Schaufele RL, Sein T, Walsh TJ. Galactomannan Antigenemia in Pediatric Oncology Patients With Invasive Aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(9):815-9.
- Alhambra A, Cuétara MS, Ortiz MC, Moreno J-M, Del Palacio A, Pontón J, et al. False positive galactomannan results in adult hematological patients treated with piperacillin-tazobactam. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24:106-12.
- Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso ICE, Severo LC. Cross-Reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus* Species in the Commercial *Platelia Aspergillus* Enzyme Immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16:132-3.
- Del Palacio A, Alhambra A, Cuétara MS, Pontón J. Estado actual del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos emergentes. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24:187-97.
- Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Darras V, Latge J-P. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immun.* 1992; 60(6):2237-45.
- Wheat LJ. Galactomannan Antigenemia Detection for Diagnosis of Invasive Aspergillosis, Part II. *Clin Microbiol News.* 2005; 27(8):59-63.
- Zandijk E, Mewis A, Magerman K, Cartuyvels R. False-Positive Results by the *Platelia Aspergillus* Galactomannan Antigen Test for

- Patients Treated with Amoxicillin-Clavulanate. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 July; 15(7):1132-3.
20. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid Identification of Dimorphic and Yeast-Like Fungal Pathogens Using Specific DNA Probes. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3505-11.
  21. Kleinchmidt-demasters BK. Disseminated *Fusarium* infection with brain abscesses in a lung transplant recipient. *Clin Neuropathol.* 2009; 28:417-21.
  22. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5(10):609-22.
  23. Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, Walsh TJ, et al. Histoplasmosis-Associated Cross-Reactivity in the Bio-Rad Platelia *Aspergillus* Enzyme Immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(5):638-40.
  24. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B, Schwerdtfeger R, Cornely OA, Wilhelm S, Reuter S, Kern W, Sudhoff T, Morz H, Hehlmann R. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2004; 125(2):196-202.
  25. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective Comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1->3)-[beta]-D-Glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(6):2733-41.
  26. Van den Ende AHGG, Hoog GS. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Stud Mycol.* 1999; 3:151-62.
  27. Souza RM, Santo FHE, Santana RF, Lopes MVO. Diagnósticos de enfermagem identificados em pacientes onco-hematológicos: mapeamento cruzado. *Esc Anna Nery.* 2015; 19: 54-65.
  28. Bossche DV, Bel A, Hendrickx M, Becker A, Jacobs R, Naessens A, Piérarda D. Galactomannan Enzymatic Immunoassay Cross-Reactivity Caused by *Prototheca* Species. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(10):3371-3.
  29. Huang YT, Hung CC, Liao CH, Sun HY, Chang SC, Chen YC. Detection of Circulating Galactomannan in *Penicillium marneffe* Infection and Cryptococcosis Among Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9):2858-62.
  30. Tortorano AM, Esposto MC, Prigitano A, Grancini A, Ossi C, Cavanaugh C, et al. Cross-Reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(3):1051-3.
  31. Novarett M, Ruiz A, Dulley F, Dorlhiac-Llacer P, Dalton C. Detecção de *Aspergillus* sp pela técnica de PCR-Nested em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008; 30(2):162-6.
  32. Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, Bleakley M, Bradstock K, Chen S. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol.* 2005; 132:478-86.
  33. Pereira MR, Rocha-Silva F, Graciele-Melo C, Lafuente CR, Magalhães T, Caligiorno RB. Comparison between Conventional and Real-Time PCR Assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Bio Med Res Intern.* 2014; 1:1-4.