

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da acurácia diagnóstica da galactomanana no lavado broncoalveolar de
pacientes com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva**

Rafaela Manzoni Bernardi

Porto Alegre, 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas

Avaliação da acurácia diagnóstica da galactomanana no lavado broncoalveolar de pacientes
com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva

Rafaela Manzoni Bernardi

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Pneumológicas, à Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Pneumológicas

Orientadora: Prof^ª. Dra. Denise Rossato Silva

Porto Alegre, 2019

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Renato e Roselaine, e à minha irmã, Renata, por todo incentivo durante todos esses anos de estudo. Sem vocês, nada disso seria possível!

Dedico também ao meu esposo, por todo o apoio e incentivo nessa importante etapa!

AGRADECIMENTOS

À minha professora orientadora Denise Rossato Silva por todo o auxílio e incentivo que, com certeza, foram essenciais para realização deste trabalho.

Às acadêmicas de Medicina, Sizuane e Ellis, pela ajuda com as coletas dos dados.

SUMÁRIO:

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	11
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos.....	32
4 REFERÊNCIAS	33
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	37
6 CONCLUSÕES.....	52
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

LISTA DE FIGURAS:

Figure 1. Flow chart of patients included in the study

Figure 2. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for the Detection of IPA with BALF GM test with a OD index cutoff point of 0.67

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Critérios EORTC

Table 1: Characteristics of IPA and non-IPA patients

Table 2: Performance of BALF GM for diagnosis of IPA at different cutoff values

LISTA DE ABREVIATURAS:

ABPA: aspergilose broncopulmonar alérgica

API: aspergilose pulmonar invasiva

BDG: 1,3 β -D-glucana

DO: densidade óptica

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

EORTC/MSG: 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

GM: Galactomanana

HIV: human immunodeficiency vírus (vírus da imunodeficiência humana)

LBA: lavado broncoalveolar

LMA: leucemia mieloide aguda

PCR: reação da polimerase em cadeia

SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC: sistema nervoso central

TMO: transplante de medula óssea

TC: tomografia computadorizada

UTI: unidade de tratamento intensivo

RESUMO

Introdução: A Galactomanana (GM) é um componente polissacarídeo da parede celular de espécies de *Aspergillus* que é liberado durante o crescimento das hifas. Diversos estudos têm sido realizados para avaliar a acurácia da GM no lavado broncoalveolar (LBA), entretanto, ainda há controvérsias em relação ao ponto de corte ideal da GM no LBA. O objetivo deste estudo foi determinar a acurácia diagnóstica e o ponto de corte ideal da GM no LBA em pacientes com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva (API) em um hospital terciário. **Métodos:** Estudo transversal. Todos os pacientes (≥ 18 anos) que realizaram broncoscopia com LBA devido à suspeita de API, e que o LBA foi testado para GM foram incluídos no estudo. API foi diagnosticada de acordo com os critérios da 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). **Resultados:** 188 pacientes preencheram os critérios e foram incluídos no estudo. O ponto de corte ideal para GM no LBA foi 0,67, com sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 100% (95% CI 69.2-100.0), 70% (95% CI 57.9-80.4), 32.3% (95% CI 25.0-40.5), e 100% (95% CI 90.9-100.0), respectivamente. A área abaixo da curva ROC foi 0.907 (95% CI 0.82-0.96; $p < 0.0001$). **Conclusão:** A detecção da GM no LBA provou ser uma ferramenta útil no diagnóstico precoce de API, em pacientes neutropênicos e não neutropênicos.

Palavras-chave: aspergilose pulmonar invasiva; galactomanana; lavado broncoalveolar; malignidades hematológicas; *Aspergillus*

ABSTRACT

Introduction: Galactomannan (GM) is a polysaccharide component of the cell wall of *Aspergillus* species that is released during the growth of hyphae. Several studies have been carried out to evaluate the accuracy of GM in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); however, there are still controversies about the optimal cut-off point of BALF GM. The objective of this study was to determine the diagnostic accuracy and the optimal cut-off point of BALF GM of patients with suspected invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in a tertiary care hospital. **Methods:** Cross-sectional study. All adult patients (≥ 18 years) who underwent a bronchoscopy with BAL due to suspected IPA, and who had BALF tested for GM were included in the study. IPA was diagnosed according to 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) guidelines. **Results:** A total of 188 patients met the inclusion criteria and were included in the study. The optimal cut-off point for BALF GM OD index was 0.67, with sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 100% (95%CI 69.2-100.0), 70% (95%CI 57.9-80.4), 32.3% (95%CI 25.0-40.5), and 100% (95%CI 90.9-100.0), respectively. The area under the ROC curve was 0.907 (95% CI 0.82 - 0.96; $p < 0.0001$). **Conclusions:** BALF GM detection proved to be a useful adjunct in the early diagnosis of IPA, in neutropenic and nonneutropenic patients.

Keywords: invasive pulmonary aspergillosis; galactomannan; bronchoalveolar lavage fluid; hematological malignancies; *Aspergillus*

INTRODUÇÃO:

Aspergilose pulmonar invasiva (API) é uma infecção potencialmente letal causada por *Aspergillus fumigatus*, assim como por outras espécies de *Aspergillus*, que estão amplamente distribuídas no solo e em matérias orgânicas¹. Ocorre quase exclusivamente em pacientes imunocomprometidos², com neutropenia prolongada sendo o principal fator de risco.³ Apesar disso, a incidência de casos está aumentando em pacientes não neutropênicos, incluindo receptores de transplante de pulmão, pacientes críticos e pacientes em uso de corticoterapia⁴. Globalmente, aproximadamente 200.000 casos de API são estimados anualmente⁵. A prevalência está entre 1-15%⁵ e a mortalidade geral se mantém alta, em torno de 30 a 50% na população em geral⁶, e pode exceder 90% em determinadas populações.⁷

O diagnóstico de API depende de uma constelação de achados clínicos, radiológicos e critérios microbiológicos.⁸ A alta taxa de mortalidade resulta em parte das dificuldades de estabelecer um diagnóstico precoce devido às manifestações clínicas inespecíficas, achados radiológicos tardios e baixo rendimento de culturas.⁷ O padrão-ouro para diagnóstico de doenças invasivas fúngicas é a análise histopatológica ou cultura de amostras teciduais, o que raramente é possível devido aos riscos envolvidos na realização de biópsias em pacientes pancitopênicos.⁵

Visto que o atraso ou erro diagnóstico nesses pacientes pode resultar em diversos problemas tanto devido a toxicidade de drogas quanto devido ao uso inapropriado de tratamentos, alto custo das medicações e alta mortalidade, o diagnóstico precoce é fundamental.⁹

A galactomanana (GM) é um componente polissacarídeo da parede celular de espécies de *Aspergillus*, que é liberado durante o crescimento das hifas.¹⁰ A habilidade de ser detectada em fluidos corporais e sangue em estágios precoces de doença, faz dela uma candidata ideal para diagnóstico de API.⁸ Diversos estudos^{8,9,10}, têm sido realizados para avaliar a acurácia da GM no lavado broncoalveolar (LBA), entretanto, ainda há várias controvérsias em relação ao ponto de corte ideal

da GM no LBA. O objetivo desse estudo foi determinar a acurácia diagnóstica e o ponto de corte ideal da GM no LBA em pacientes com suspeita de API em um hospital terciário.

1. REVISÃO DE LITERATURA:

1.1. Aspergilose Pulmonar: apresentações

O termo aspergilose pulmonar refere - se a um espectro de doenças relacionadas à colonização ou infecção pelo *Aspergillus*, um fungo filamentoso. O gênero *Aspergillus* inclui mais de 185 espécies, sendo que dessas, cerca de vinte já foram reportadas como causadoras de infecções oportunistas em humanos. A distribuição de espécies pode diferir de acordo com a epidemiologia local.¹¹ Embora existam diversas espécies de *Aspergillus* no ambiente, o *Aspergillus fumigatus* é a espécie patogênica mais comum em humanos, sendo que o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus niger* também são reportados com maior frequência.¹²

Sabe-se que a presença de doença pulmonar preexistente ou disfunção imunológica são fatores predisponentes para aspergilose pulmonar. Entretanto, estudos recentes demonstraram que a presença de grau leve a moderado de imunossupressão já representa um fator de risco para doença.¹² As manifestações histológicas, clínicas e radiológicas da aspergilose pulmonar são determinadas pelo número e virulência do microorganismo e também pela resposta imune do paciente.²

A aspergilose pulmonar pode ser subdividida em cinco categorias: (a) Aspergilose saprofítica (Aspergiloma), (b) Aspergilose broncopulmonar alérgica (reação de hiperssensibilidade), (c) Aspergilose semi-invasiva (necrotizante crônica), (d) Aspergilose invasiva de via aérea (traqueobronquite aguda) e (e) Aspergilose angioinvasiva.²

A aspergilose saprofítica (aspergiloma simples) é caracterizada por infecção por *Aspergillus* sem invasão tecidual. O aspergiloma ou bola fúngica, consiste em uma massa de micélios de fungo, células inflamatórias, fibrina, muco e debris celulares que usualmente se desenvolve em cavidades pulmonares pré-existentes, sendo as causas subjacentes mais comuns, a tuberculose e a sarcoidose.² Anticorpos IgG contra *Aspergillus* são positivos em praticamente todos os casos. Os pacientes são em sua maioria assintomáticos, porém, em alguns casos, pode causar hemoptise.¹³

A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) representa uma reação de hipersensibilidade aos antígenos do fungo *Aspergillus*. Ocorre tipicamente em pacientes com asma de longa data ou fibrose cística. Estima-se que cerca de 7-14% dos pacientes com asma, em uso de corticoterapia prolongada, e 6% dos pacientes com fibrose cística apresentem critérios diagnósticos para ABPA.¹³ Os fungos proliferam no lúmen das vias aéreas, resultando na produção constante de antígenos, ocorrendo uma reação de hipersensibilidade tipo I com produção de IgE e IgG. Esses complexos imunes e células inflamatórias são depositados na mucosa brônquica, produzindo necrose e infiltrados eosinofílicos (reação de hipersensibilidade tipo III), causando lesão na parede brônquica e bronquiectasias. Os sintomas clínicos incluem broncoespasmo persistente, mal-estar, febre baixa e produção de escarro.²

A aspergilose semi-invasiva, também conhecida como aspergilose necrotizante crônica, é caracterizada pela necrose tecidual e inflamação granulomatosa similar a uma reativação de tuberculose. Os fatores associados com o desenvolvimento dessa forma de aspergilose incluem doenças crônicas debilitantes, diabetes mellitus, má-nutrição, alcoolismo, idade avançada, uso prolongado de corticoterapia e doença pulmonar obstrutiva crônica.² Os pacientes geralmente se apresentam com sintomas crônicos, com cerca de 1 a 6 meses de duração, incluindo febre, tosse, expectoração e perda de peso.¹³

A aspergilose invasiva é a forma de apresentação mais grave e com maior mortalidade. É subdividida em 2 entidades: aspergilose invasiva de via aérea e aspergilose angioinvasiva. A aspergilose invasiva de via aérea é caracterizada pela presença de *Aspergillus* profundamente na membrana basal da mucosa da via aérea. Ocorre mais frequentemente em paciente com SIDA, usuários de corticoterapia prolongada e transplantados de órgãos sólidos.² Já a aspergilose angioinvasiva ocorre quase que exclusivamente em pacientes com imunossupressão grave, sendo neutropenia severa o principal fator de risco. Nessa forma, ocorre invasão e oclusão de artérias pulmonares de pequeno e médio calibre pelas hifas, o que leva a formação de nódulos hemorrágicos necróticos.²

Nos últimos anos, tem havido um importante aumento do número de pacientes com risco de desenvolver aspergilose invasiva devido ao desenvolvimento de novas medicações quimioterápicas para tumores sólidos, assim como aumento de número de pacientes transplantados e em uso de imunossupressores,² o que torna essa entidade de alta importância para desenvolvimento de novos estudos e pesquisas.

1.1.1. Aspergilose Pulmonar Invasiva (API)

Aspergilose pulmonar invasiva é uma infecção potencialmente letal causada pela invasão de paredes brônquicas e arteríolas pelas hifas fúngicas. A apresentação da doença é aguda e relativamente rápida, evoluindo de poucos dias a semanas.⁴ Ocorre primariamente em indivíduos imunossuprimidos, especialmente em pacientes com neutropenia, sendo que o risco de aspergilose invasiva está fortemente correlacionado a duração e ao grau de neutropenia.³

Apesar disso, nos últimos anos, a incidência da doença vem aumentando em indivíduos não neutropênicos, com comprometimento imune leve a moderado. Entre os fatores de risco associados, o uso crônico de corticoterapia tem se destacado. Transplantados de órgãos sólidos (particularmente pulmão e coração), pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), pacientes críticos de unidade de terapia intensiva (UTI) e hepatopatas também tem apresentado aumento do número de casos relatados.⁴

A doença geralmente se apresenta com sintomas inespecíficos, como tosse, dispneia e febre. Em casos mais avançados, hemoptise é mais comum. Na maioria dos casos, a suspeita ocorre em pacientes imunossuprimidos que apresentam infiltrados pulmonares sem resposta ao uso de antibioticoterapia de amplo espectro.⁴

Há duas subcategorias da API, a forma invasiva de vias aéreas e a forma angioinvasiva. A forma invasiva de via aérea, representa cerca de 15-30% casos e é definida pela presença do *Aspergillus* na membrana basal do brônquio, e acomete principalmente pacientes transplantados de órgãos sólidos e pacientes com HIV. Já a forma angioinvasiva, é histologicamente caracterizada por invasão e oclusão de artérias pulmonares de pequeno a médio calibre pelas hifas, e acomete principalmente pacientes com doenças hematológicas.³

Visto que o atraso diagnóstico ou o erro diagnóstico nesses pacientes pode resultar em diversos problemas, como toxicidade por drogas devido a tratamentos inapropriados, alto custo medicamentoso e mortalidade, o diagnóstico precoce é fundamental.⁶

1.1.2. Aspergilose Pulmonar invasiva: epidemiologia

No mundo, são estimados cerca de 200.000 casos anuais de aspergilose invasiva.⁵ A prevalência está em torno de 1 a 15%⁵ e a taxa de mortalidade global se mantém alta, em torno de 30 a 50% na população em geral⁶, podendo exceder 90% em determinadas populações.⁷

A API tem sido descrita classicamente em pacientes neutropênicos, no contexto de doenças hematológicas malignas. Pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) em quimioterapia intensiva apresentam risco de cerca de 7-11% de desenvolver API.¹¹ O risco de desenvolver API aumenta conforme a duração da neutropenia e é estimado em cerca de 1% por dia nas primeiras 3 semanas, aumentando para 4% por dia a partir da terceira semana.¹³ Em pacientes neutropênicos, a angioinvasão é mais comum e é responsável pela maior frequência de disseminação para outros órgãos, como pele, sistema nervoso central (SNC) e olhos.⁴

Já pacientes receptores de transplante de medula óssea (TMO) alogênico com condicionamento mieloablativo, apresentam incidência de API estimada entre 7-15%, apresentando dois picos de incidência: o primeiro na fase precoce pós-enxerto após a segunda semana da aplasia e o segundo pico, mais tardio, após o terceiro mês, na fase de imunossupressão e tratamento da doença enxerto versus hospedeiro com corticoterapia.⁶

Apesar da incidência em pacientes neutropênicos se manter elevada, a incidência da doença vem aumentando em indivíduos com comprometimento imune leve a moderado, como pacientes com doenças pulmonares crônicas, doenças hepáticas, usuários crônicos de corticosteróides, diabéticos, pacientes com SIDA e pacientes críticos em UTIs.¹³ Ademais, a aspergilose é a infecção fúngica mais comum em transplantados de pulmão, representando cerca de 44% das infecções fúngicas nesses pacientes.⁴ Nesses casos, a traqueobronquite é a manifestação inicial e mais comum, usualmente diagnosticada através de ulcerações ou pseudomembranas visualizadas na broncoscopia. A angioinvasão tende a ocorrer mais tardiamente, associada à disseminação para outros órgãos.⁴

A Aspergilose Invasiva também tem sido progressivamente mais descrita em pacientes críticos de UTI, sendo que a maioria não possui os fatores de risco comuns relacionados à doença.

Em indivíduos com quadro de sepse, a resposta imune é bifásica, com uma fase inicial inflamatória que é seguida por uma fase final anti-inflamatória. Quando essa última reação é excessiva, pode levar a uma “imunoparalisia”, também conhecida como síndrome de resposta anti-inflamatória. Consequentemente, o paciente é considerado temporariamente imunocomprometido e pode estar em risco de desenvolver API.¹⁵

Existem também relatos raros na literatura de API em indivíduos saudáveis, com exposição maciça ao fungo, através de exposições ambientais.¹⁶

1.1.3. Aspergilose Pulmonar Invasiva: patogênese

O *Aspergillus* pode ser encontrado em todo o mundo e apresenta tropismo preferencial por solo úmido. Devido a alta capacidade de esporulação do *Aspergillus*, o ar contém 1–100 esporos.m⁻³. Como os conídios liberados no ar após a esporulação do *Aspergillus* são pequenos suficientes (2-3mm) para alcançar os alvéolos, o pulmão é o órgão mais afetado¹⁵. A concentração de esporos no ar aumenta em construções / reformas de edifícios e deve ser monitorizada se ocorrer em hospitais.³

A Aspergilose Pulmonar Invasiva é uma doença agressiva devido à invasão da parede brônquica e das arteríolas adjacentes pelas hifas.¹⁵ A contaminação ocorre através da inalação dos esporos dos fungos, que estão naturalmente no ar. Em indivíduos imunocompetentes, esses esporos são parcialmente eliminados através do clearance muco-ciliar. Posteriormente, através da imunidade inata, macrófagos alveolares eliminam conídios remanescentes. Em pacientes neutropênicos ou com algum grau de imunossupressão / uso de corticoterapia que possa gerar inibição da atividade imune, os esporos permanecem no espaço alveolar e se transformam para forma filamentosa.⁶

A forma invasiva das vias aéreas é responsável por 15 a 30% da API e é definida pela presença do *Aspergillus* profundamente na membrana basal dos brônquios. ³

A forma angioinvasiva é histologicamente caracterizada pela invasão de artérias pequenas e médias pulmonares por hifas fúngicas. A angioinvasão leva a trombose vascular, infarto tecidual e necrose de coagulação e é típica de pacientes neutropênicos.³

1.1.3.1. Aspergilose Pulmonar Invasiva: manifestações clínicas

A aspergilose invasiva afeta com maior frequência os pulmões e seios paranasais, podendo também afetar SNC, olhos, ossos, coração e causar doença disseminada.¹¹ Os sintomas da AI são inespecíficos e, no caso da API, frequentemente mimetizam um quadro de broncopneumonia, o que contribui para o atraso diagnóstico.³ Além disso, as manifestações e a severidade dependem do status imune do paciente.⁴

Os pacientes com API podem apresentar febre, dor torácica, dispneia, tosse e hemoptise.¹² A tríade clássica que tem sido descrita em pacientes neutropênicos inclui febre, dor torácica pleurítica e hemoptise. A primeira e principal manifestação clínica é a tosse (92% dos casos), geralmente acompanhada de dispneia e desconforto respiratório. Febre resistente apesar de 72h de antibioticoterapia também deve chamar atenção para o diagnóstico em imunossuprimidos. A dor torácica ocorre mais tardiamente, durante o estágio de doença invasiva, assim como a hemoptise, que pode ser severa em casos de perfuração arterial.⁶

Devido à predileção do *Aspergillus* em invadir os vasos sanguíneos, a API geralmente causa áreas de infarto e hemorragia pulmonar, e se espalha hematogenicamente para os demais órgãos, principalmente o SNC, podendo causar infartos cerebrais, hemorragia intracraniana, meningite e abscesso epidural.¹³

1.1.3.2. Aspergilose Pulmonar Invasiva: manifestações radiológicas

A radiografia de tórax convencional geralmente não é suficiente para sugerir o diagnóstico em fase inicial, sendo a tomografia de tórax computadorizada o exame de escolha para diagnóstico precoce.¹¹

Um estudo retrospectivo¹⁷ avaliou as imagens de TC de tórax de 235 pacientes com API, na apresentação da doença, demonstrando um ou mais macronódulos (94% pacientes), sinal do halo (61%), consolidações (30%), lesões cavitárias (20%) e sinal do crescente (10%) .

Infiltrados causados pela aspergilose pulmonar invasiva consistem principalmente em pequenos nódulos (1-3cm), envoltos ou não por halo em vidro fosco (Sinal do Halo). O sinal do halo representa hemorragia perifocal devido a angioinvasão pelo patógeno e consequente infarto. Esse sinal não é patognomônico da doença, mas é sugestivo de API inicial. O diagnóstico diferencial de “halo em vidro fosco” em pacientes neutropênicos deve incluir infecção por Candida, Herpes simplex e CMV, Granulomatose de Wegener, metástases ou Sarcoma de Kaposi.³ Pacientes com sinal do halo tiveram melhor resposta ao tratamento (52% vs 29%) e maior sobrevida em 84 dias (71% vs 53%), comparado a pacientes com outros achados de imagem.¹⁷

Outros sinais como nódulos sem sinal do halo, cavitações (especialmente com sinal do crescente), consolidações também podem sugerir o diagnóstico de API.¹¹

Os achados típicos da forma angioinvasiva consistem em macronódulos com áreas de atenuação em vidro fosco (“sinal do halo”) e áreas de consolidação com base pleural, semelhantes a observadas em infartos pulmonares. ³

Já a forma invasiva de vias aéreas radiologicamente pode mimetizar bronquiolite com nódulos centrolobulares irregulares com aparência em brotamento, semelhante à observada na disseminação endobrônquica da tuberculose. A apresentação com broncopneumonia é comum, com confluência de consolidações peribrônquicas, semelhante à broncopneumonia bacteriana. ³

1.1.4. Aspergilose Pulmonar Invasiva: diagnóstico

O diagnóstico precoce da API ainda é um desafio.¹⁸ O exame considerado padrão-ouro para diagnóstico de doenças fúngicas invasivas é análise histopatológica ou cultura de amostras teciduais, o que raramente é possível, devido aos riscos envolvidos em realizar biópsias em pacientes pancitopênicos.⁵ Hemoculturas raramente são positivas, e quando são positivas, geralmente representam casos de doença avançada.¹¹

Visto isso, o diagnóstico de API é baseado em uma constelação de critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos.⁸ A alta taxa de mortalidade resulta em parte das dificuldades de estabelecer um diagnóstico precoce devido a manifestações clínicas inespecíficas, atraso nos achados radiológicos e baixo rendimento das culturas.⁷

Os critérios diagnósticos mais utilizados são os critérios da 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), publicados em 2008. Esses critérios incluem fatores do hospedeiro, critérios clínicos e critérios micológicos, o que classifica os pacientes em AI provada (evidência de acometimento por *Aspergillus* em espécime de biópsia), AI provável (presença de fator do hospedeiro, critério clínico e micológico), AI possível (presença de fator do hospedeiro e critério clínico) ou não – aspergilose (presença apenas de fator do hospedeiro ou critério clínico ou ausência de critérios).¹⁹ [tabela 1]

Tabela 1: Critérios EORTC

Fatores do Hospedeiro:

- Neutropenia recente (< 500 neutrófilos/mm³ por mais de 10 dias) temporalmente relacionada ao início da doença
- Uso prolongado de corticosteroides (> 0,3mg/kg/dia prednisona ou equivalente por mais de 3 semanas)
- Uso de outros imunossupressores (ciclosporina, anti-TNF, anticorpos monoclonais específicos ou análogos de nucleosídeos) nos últimos 90 dias
- Receptor de transplante de células tronco alogênico
- Imunodeficiência severa (doença granulomerosa crônica ou imunodeficiência severa combinada)

Critérios clínicos:

Sinais de doença do trato respiratório inferior - alterações na TC tórax:

- Lesões densas, bem circunscritas com ou sem sinal do halo
- Sinal do crescente aéreo
- Cavidades

Sinais de traqueobronquite - alterações na FBC:

- Ulcerações traqueobrônquicas, nódulos, pseudomembranas, placas ou erosões

Sinais de infecção sinusal:

- imagem demonstrando sinusite mais 1 dos 3 sinais: dor compatível localizada / úlcera nasal com necrose / extensão dos seios paranasais para osso, incluindo a órbita

Sinais de infecção de SNC:

- 1 dos 2 sinais: lesões focais ou acometimento meníngeo na RNM ou TC crânio

Critério micológico:

Testes diretos: Citologia, microscopia direta ou cultura positiva

Testes indiretos: Galactomanana positiva ($\geq 0,5$) no plasma, soro, LBA ou líquido / beta-D glucano no soro

Diagnóstico pelo EORTC:

- (1) aspergilose comprovada
- (2) aspergilose provável
- (3) aspergilose possível
- (4) não – aspergilose

Os fatores do hospedeiro são características do indivíduo que aumentam o risco de API e incluem história de neutropenia recente (menos de 500 neutrófilos/mm³ por mais de 10 dias), receptor de TMO alogênico, uso de corticoterapia prolongada (mais de 0,3mg/kg prednisona ou equivalente por mais de 3 semanas), imunodeficiências e uso de drogas imunossupressoras nos últimos 90 dias (incluindo ciclosporina, inibidores de TNF-alfa, anticorpos monoclonais específicos e análogos de nucleosídeos).¹⁹

Os critérios clínicos incluem alterações radiológicas sugestivas na TC de tórax (como lesões nodulares densas com ou sem sinal do halo, cavitações ou sinal do crescente), sinais de traqueobronquite invasiva na avaliação broncoscópica (ulcerações, nódulos ou placas), sinais de infecção sinusal invasiva ou evidência de alteração em SNC.¹⁹

Já os critérios micológicos incluem tanto exames diretos quanto indiretos. Entre os diretos, então incluindo exames citológicos, micológicos diretos ou culturas com *Aspergillus*, de amostras de escarro, lavado broncoalveolar, escovado brônquico ou aspirado sinusal. Entre os indiretos, estão incluídos a presença de b-D glucano sérico e presença de Galactomana no plasma, soro, lavado broncoalveolar ou líquido. O ponto de corte utilizado nos critérios diagnósticos da EORTC-MSG 2008 para galactomana em todas as espécimes é de 0,5 (OD).¹⁹

1.1.5. Aspergilose Pulmonar Invasiva: diagnóstico microbiológico

O diagnóstico precoce da API ainda é difícil devido a variabilidade de performance dos testes utilizados e baixo rendimento de culturas.¹⁸ O padrão-ouro para diagnóstico de doenças fúngicas invasivas é análise histopatológica ou cultura de amostras teciduais, o que raramente é possível, devido aos riscos envolvidos.⁵

O método tradicional para diagnóstico de API envolve a cultura de *Aspergillus* e a utilização de esquemas de identificação baseado em fenótipos, como forma, tamanho, cor e ornamentação para distinguir espécies. Embora tenha custo baixo e a vantagem de testes adicionais, por exemplo, avaliação de resistência aos antibióticos, a lentidão (2-5 dias no mínimo) torna-o menos ideal para o diagnóstico precoce. Além disso, a cultura não é um método de detecção sensível e embora um resultado de cultura positivo identifique uma infecção, também pode ser resultado de colonização na ausência de evidências de infecção invasiva e a depender do estado imune do paciente. A microscopia também oferece baixa sensibilidade e estruturas só conseguem ser vistas se estiverem em abundância, geralmente em estágios mais tardios.²⁰

Sorologia para *Aspergillus* não tem sido utilizada no diagnóstico de API. A detecção de anticorpos de *Aspergillus* não é útil, provavelmente devido à fraca resposta imune de pacientes com API e a rapidez com que a infecção ocorre, sem tempo suficiente para resposta de anticorpos adequada.¹³

Nas últimas décadas, vem sendo desenvolvidos novos testes diagnósticos não baseados em culturas, os testes indiretos, que incluem galactomanana (GM), 1,3 β -D-glucana [BDG] e detecção de DNA baseada em PCR. Esses testes representam um grande avanço no diagnóstico precoce e manejo desses pacientes. Eles são baseados na detecção de componentes da parede fúngica e detecção de DNA de *Aspergillus* em amostras clínicas.²¹

A GM é um componente polissacarídeo da parede celular de espécies de *Aspergillus* que é liberado durante o crescimento das hifas.¹⁰ A capacidade de ser detectada em fluidos corporais e no

sangue em fases iniciais da doença faz dela um candidato ideal para o diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva.⁸

Outro polissacarídeo presente na parede celular de *Aspergillus spp.* é o beta-D Glucano (BDG). Ao contrário do GM, o BDG é um componente da célula paredes de muitos fungos patogênicos, incluindo *Candida*, *Fusarium* e *Pneumocystis*.²² No geral, o ensaio BDG tem uma sensibilidade de 77% e uma especificidade de 85% para o diagnóstico de provável. Infelizmente, o ensaio de BDG não é patogênico e, portanto, não pode diferenciar espécies de fungos. As principais limitações dos testes de BDG para uso rotineiro são sua baixa especificidade e ocorrência frequente de reações falso-positivas.²³

Os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram desenvolvidos para o diagnóstico de doença fúngica invasiva. A principal vantagem da detecção molecular da aspergilose por aspergilose invasiva é a sensibilidade muito alta para a detecção de PCR *Aspergillus* DNA,²⁴ entretanto, ainda não foi incluído nas definições de consenso do EORTC-MSG de 2008.¹⁹

Atualmente, a detecção de GM no soro e no LBA e o BDG são considerados critérios diagnósticos microbiológicos, de acordo com o guideline da *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).¹⁹ No entanto, apesar dos diversos estudos sobre o assunto, ainda não há consenso sobre o valor de ponto de corte ideal (do índice de densidade óptica) da GM no LBA para o diagnóstico de aspergilose invasiva.²⁵

1.1.4.2: Método de detecção da Galactomanana

A célula fúngica é quase que exclusivamente composta por polissacarídeos e a GM é o polissacarídeo presente na parede celular das espécies de *Aspergillus*. Durante a fase de crescimento fúngico, a GM é incorporada a parede celular. Conforme o crescimento apical continua, a ponta da hifa se torna mais fraca, liberando GM. Estudos demonstram que os níveis de GM estão diretamente relacionados ao grau de angioinvasão. Modelos animais experimentais e séries de autópsias têm revelado importantes diferenças entre a patologia da aspergilose entre usuários de corticosteroides e pacientes neutropênicos. No caso dos pacientes neutropênicos é caracterizada por extensa angioinvasão, trombose hemorrágica e necrose; já em imunocomprometidos por uso crônico de corticosteróides, ocorre menor grau de angioinvasão, e conseqüentemente a GM pode ter valores menores.²¹

O Imunoensaio enzimático em sanduíche Platelia *Aspergillus* (EIA) é utilizado para detecção de GM. Esse teste utiliza o EB-A2, um anticorpo monoclonal derivado de ratos, que se liga especificamente a quatro resíduos de galactofuranose da molécula GM. Com a presença de antígeno na amostra, um complexo de anticorpo monoclonal - GM é formado. Um substrato cromogênico é adicionado para revelar a presença de tais complexos, tornando-se azul. As microplacas são lidas usando um leitor óptico que calcula a relação da densidade óptica (DO) em relação a um controle fornecido pelo fabricante (Índice OD [ODI]). Os resultados do ensaio são relatados como ODI.²¹

Apesar de específico para espécies de *Aspergillus*, GM também está presente em parede celular de *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Acremonium* e *Histoplasma capsulatum*. Assim, reatividade cruzada com outros fungos já foi relatada.²⁶ O uso de antibióticos beta-lactâmicos aumentou a taxa de falsos positivos em alguns estudos.⁷

A GM sérica foi avaliada principalmente em pacientes receptores de TMO alogênicos e pacientes neutropênicos. Dados nos demais pacientes são mais escassos e alguns estudos sugerem pior performance nesses pacientes.²⁷ Tanto a GM sérica quanto no LBA são utilizadas para

diagnóstico de API, entretanto, estudos tem demonstrado melhor acurácia da GM no LBA comparada a GM sérica. Sugere-se que isso ocorra devido a maior carga fúngica no pulmão. A GM no LBA também é particularmente útil em pacientes não neutropênicos com aspergilose pulmonar que tipicamente não terão um resultado de GM sérico positivo. ¹

Diversos estudos vêm sendo realizados com vistas a avaliar a acurácia e ponto de corte ideal da GM no LBA, entretanto ainda há controvérsias sobre o assunto.¹

Em 2010, foi realizada uma metanálise⁷, incluindo 13 estudos, com vistas a avaliar a acurácia do LBA para diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva. Dos estudos incluídos, quatro utilizaram o ponto de corte de 0,5, sete utilizaram o ponto de corte de 1,0, e os outros dois utilizaram 1,5 e 2,0. Esse estudo demonstrou uma boa acurácia do método diagnóstico, entretanto, devido à grande heterogeneidade dos estudos, não foi possível determinar um ponto de corte ótimo para diagnóstico. Além disso, destaca-se o número pequeno de pacientes nos estudos individuais, sendo o maior deles com 116 pacientes e apenas 4 casos como AI provável e 2 casos de AI provada.

Outra metanálise¹, publicada em 2012, incluiu 30 estudos também com diferentes pontos de corte para diagnóstico (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5). Esse estudo sugeriu que o ponto de corte ideal para diagnóstico seria 1,0. Além disso, comparou GM sérica e no LBA, demonstrando maior sensibilidade da GM no LBA, porém com menor especificidade. Entre as limitações, também se destaca a heterogeneidade dos estudos incluídos.

Outro estudo²⁸ foi publicado em 2016 com vistas a avaliar a acurácia da GM no LBA em pacientes internados na UTI. Esse estudo incluiu 85 pacientes e propôs a inclusão da GM no *AspICU algorithm* (algoritmo utilizado para diagnóstico de aspergilose invasiva em pacientes na UTI) com vistas a aumentar a sensibilidade do diagnóstico em pacientes críticos. Nesse estudo, o ponto de corte sugerido foi 0,5 e demonstrou uma sensibilidade de 88%. Além disso, verificou-se que o valor da GM foi mais alto nos pacientes que tinham cultura positiva para *Aspergillus* comparado aos que tinham cultura negativa.

Diversos avanços vem sendo alcançados em relação a esse assunto. A detecção de GM no soro e no LBA, inclusive já foi incluída nos critérios diagnósticos microbiológicos, no guideline da *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)¹⁹. No entanto, ainda não há um consenso sobre o valor de corte ideal na população em geral e em grupos específicos, como pacientes internados em UTI e pacientes neutropênicos.

1.1.6. Aspergilose Pulmonar Invasiva: tratamento

Um fator importante que contribui para alta mortalidade da API é a dificuldade diagnóstica, o que leva a um atraso de início do tratamento. Tratamento antifúngico precoce é um fator prognóstico crucial nos casos de API.⁶

O guideline da Infectious Diseases Society of America recomenda o uso de voriconazol como terapia primária para aspergilose invasiva. Voriconazol foi mais efetivo que anfotericina B deoxicolato como terapia inicial e foi associado a maior sobrevida (71% vs. 58%) em um estudo. Pior resposta a terapia ocorreu em pacientes com doença extra-pulmonar e receptores de TMO alogênico.²⁹

Combinação de voriconazol com equinocandina pode ser considerada em pacientes selecionados, porém a terapia inicial com equinocandina geralmente não é indicada. Anfotericina B pode ser utilizada nos casos de falha terapêutica ou em caso de indisponibilidade de voriconazol.³⁰

O tempo de tratamento deve ser de 6-12 semanas, a depender do grau e da duração da imunossupressão. Para pacientes tratados com sucesso, que necessitarão de subsequente imunossupressão, é recomendada profilaxia secundária, com vistas a prevenção de recorrência.³⁰

GM sérica seriada tem sido utilizada como marcador terapêutico visto que um nível em queda é correlacionado a sucesso terapêutico e níveis em elevação relacionados à falha.²⁹

2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva depende de uma constelação de critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos.⁸ A alta taxa de mortalidade resulta em parte das dificuldades de estabelecer um diagnóstico precoce devido a manifestações clínicas inespecíficas, atraso nos achados radiológicos e baixo rendimento das culturas.⁷ O padrão-ouro para diagnóstico de doenças fúngicas invasivas é análise histopatológica ou cultura de amostras teciduais, o que raramente é possível, devido aos riscos envolvidos em realizar biópsias em pacientes pancitopênicos.⁵

Visto que o atraso diagnóstico ou o erro diagnóstico nesses pacientes pode resultar em diversos problemas, como toxicidade por drogas devido a tratamentos inapropriados, alto custo medicamentoso e mortalidade, o diagnóstico precoce é fundamental.¹⁹ Surgem então, novas estratégias para diagnóstico.

A GM é um componente polissacarídeo da parede celular de espécies de *Aspergillus* que é liberado durante o crescimento das hifas.¹⁰ A capacidade de ser detectada em fluidos corporais e no sangue em fases iniciais da doença faz dela um candidato ideal para o diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva.⁸

Atualmente, a detecção de GM no soro e no LBA é considerada um critério diagnóstico microbiológico, de acordo com o guideline da *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).¹⁹ No entanto, apesar dos diversos estudos sobre o assunto, ainda não há consenso sobre o valor de ponto de corte ideal (do índice de densidade óptica) da GM no LBA para o diagnóstico de aspergilose invasiva.

3. OBJETIVOS

Geral:

Determinar a acurácia diagnóstica da galactomanana no lavado broncoalveolar de pacientes com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva.

Específicos:

- 1) Avaliar sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da galactomanana no lavado broncoalveolar.
- 2) Determinar o ponto de corte ideal da galactomanana no lavado broncoalveolar.

4. REFERÊNCIAS

1. Zou M, Tang L, Zhao S, Zhao Z, Chen L, Chen P, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive Aspergillosis. *PLoS One*. 2012;7(8).
2. Franquet T, Müller NL, Giménez A, Guembe P, de la Torre J, Bagué S. Spectrum of Pulmonary Aspergillosis: Histologic, Clinical, and Radiologic Findings. *RadioGraphics*. 2013;21(4):825–37.
3. Chabi ML, Goracci A, Roche N, Paugam A, Lupo A, Revel MP. Pulmonary aspergillosis. *Diagn Interv Imaging*. 2015 May;96(5):435–42.
4. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70:270–7.
5. Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Med Wkly*. 2016;146(February):w14281.
6. Desoubeaux G, Bailly E, Chandenier J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. *Med Mal Infect*. 2014;44(3):89–101.
7. Guo YL, Chen YQ, Wang K, Qin SM, Wu C, Kong JL. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: A bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest*. 2010;138(4):817–24.
8. Gupta A, Capoor MR, Shende T, Sharma B, Mohindra R, Suri JC, et al. Comparative evaluation of galactomannan test with bronchoalveolar lavage and serum for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J Lab Physicians*. 2017;9(4):234–8.
9. Zhou W, Zhang Y, Li P, Zhang F, Shi Y, Su X, et al. Diagnostic value of galactomannan antigen test in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples from patients with nonneutropenic invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2153–61.

10. Heng SC, Morrissey O, Chen SCA, Thursky K, Manser RL, Nation RL, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41(1):124–34.
11. Karthhaus, M and Buchheidt, D. Invasive Aspergillosis: New Insights into Disease, Diagnostic and Treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 2013 vol 19, no. 20, pp. 3569–3594, 2013
12. Streck, ME and Patterson, KC. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Aspergillus Syndromes. *CHEST* 2014. 146(5):1358-1368
13. Soubani AO, Chandrasekar, PH. The Clinical Spectrum of Pulmonary Aspergillosis. *CHEST* 2002; 121: 1988-1999.
14. D'Haese J, Theunissen K, Vermeulen E, et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. *J Clin Microbiol* 2012;50:1258-1263.
15. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Review: Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 30: 782-800
16. Pilaniya V, Gera K, Gothi R, Shah A. Aspergilose pulmonar invasiva, logo após exposição ocupacional a água poluída barrenta, em indivíduo previamente saudável. *J Bras Pneumol.*2015;41(5): 473-477
17. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Rubin RH, et al. Imaging Findings in Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis: Clinical Significance of the Halo Sign. *Clinical Infectious Diseases*, 2007; 44:373-9
18. Miceli MH, Goggins, MI, Chander p, Sekaran AK, Kizy AE, Alangaden G et al. Performance of lateral flow device and galactomannan for the detection of Aspergillus species in bronchoalveolar fluid of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, 2015, 58, 368-374
19. Pauw BD, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens JE, Bennett JR, et al. Revised Definitions of Invasive

Fungal Disease from 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 Jun 15; 46 (12): 1813- 1821

20. Johnson G, Ferrini A, Dolan, SK, Nolan T, Doyle S, Bustin, AS. Biomarkers for invasive aspergillosis: the challenges continue. Biomarkers Med, 2014. 8 (3), 429-451
21. Miceli MH, Maertens J. Role of Non-Culture-Based Tests, with an Emphasis on Galactomannan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. Semin Respir Crit Care Med 2015;36:36:650-661.
22. Marty FM, Koo S. Role of (1 → 3)-β-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis, Medical Mycology 2009, 47 (Supplement I), S233-S240
23. Hoenig M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Buchheidt D. Performance of Galactomannan, Beta-D-Glucan, Aspergillus LateralFlow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. Clinical Infectious Diseases 2016;63(4):e1-60
24. Heng SC, Morrissey O, Chen SCA, Thursky K, Slavin M, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: A systematic review and meta-analysis. Clin Ver Microbiol, 2015. 41(1): 124-134
25. Gupta A, Capoor MR, Shende T, Sharma B, Mohindra R, Suri JC, Gupta DK. Comparative evaluation of galactomannan test with bronchoalveolar lavage and serum for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. J Lab Physicians 2017;9:234-8.
26. Maertens JA, Blennow O, Duarte RF, Muñoz P. The current Management landscape: aspergillosis, Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 71 (2): 23-29
27. Meerseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmwe A, Wijngaerden EV. Galactomannan in

Bronchoalveolar Lavage Fluid: A Tool for Diagnosing Aspergillosis in Intensive Care Unit Patients. *Crit Care Med* 2008; 177:27-34

28. Schroeder M, Simon M, Katchanov J, Wijaya C, Rohde H, Christner M, et al. Does galactomannan testing increase diagnostic accuracy for IPA in the ICU? A prospective observational study. *Crit Care*. 2016;20(1):1–10.
29. Segal BH, Aspergillosis. *N Engl J Med* 2009;360:1870-84
30. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JÁ, Bennett JE, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2016;63(4):e1–60

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Title: Evaluation of the diagnostic accuracy of galactomannan in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with suspected invasive pulmonary aspergillosis.

Authors: Rafaela Manzoni Bernardi¹, Sizuane Rieger Holler², Ellis Gabriela Correa de Almeida², Camila Anton^{1,3}, Felipe Dominguez Machado^{1,3}, Denise Rossato Silva^{1,2,3}.

Affiliations:

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Corresponding author: Denise Rossato Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 2350 Ramiro Barcelos Street, room 2050, Postal code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 33598241, Fax: +55 51 33598000. Email: denise.rossato@terra.com.br.

ABSTRACT

Introduction: Galactomannan (GM) is a polysaccharide component of the cell wall of *Aspergillus* species that is released during the growth of hyphae. Several studies have been carried out to evaluate the accuracy of GM in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); however, there are still controversies about the optimal cut-off point of BALF GM. The objective of this study was to determine the diagnostic accuracy and the optimal cut-off point of BALF GM of patients with suspected IPA in a tertiary care hospital. **Methods:** Cross-sectional study. All adult patients (≥ 18 years) who underwent a bronchoscopy with BAL due to suspected IPA, and who had BALF tested for GM were included in the study. IPA was diagnosed according to 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) guidelines. **Results:** A total of 188 patients met the inclusion criteria and were included in the study. The optimal cut-off point for BALF GM OD index was 0.67, with sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 100% (95%CI 69.2-100.0), 70% (95%CI 57.9-80.4), 32.3% (95%CI 25.0-40.5), and 100% (95%CI 90.9-100.0), respectively. The area under the ROC curve was 0.907 (95% CI 0.82 to 0.96; $p < 0.0001$). **Conclusions:** BALF GM detection proved to be a useful adjunct in the early diagnosis of IPA, in neutropenic and nonneutropenic patients.

Keywords: invasive pulmonary aspergillosis; galactomannan; bronchoalveolar lavage fluid; hematological malignancies; *Aspergillus*

INTRODUCTION

Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is a potentially lethal infection caused by *Aspergillus fumigatus*, as well as other *Aspergillus* species, which are widely distributed in soil and other organic matter (1). It occurs almost exclusively in immunocompromised patients (2), with prolonged neutropenia being the main risk factor (3). Despite this, the incidence of cases is increasing in non-neutropenic patients, including pulmonary transplant recipients, critical patients and patients using corticosteroids (4). Globally, approximately 200,000 cases of IPA are estimated annually (5). The prevalence is around 1 to 15% (5) and the overall mortality rate remains high, around 30 to 50% in the general population (6), and may exceed 90% in certain populations (7).

The diagnosis of IPA depends on a constellation of clinical, radiological and microbiological criteria (8). The high mortality rate results in part from the difficulties of establishing an early diagnosis due to nonspecific clinical manifestations, delayed radiological findings and low culture yield (7). The gold standard for the diagnosis of invasive fungal diseases is histopathological analysis or culture of tissue samples, which is rarely possible due to the risks involved in performing biopsies in pancytopenic patients (5).

Since diagnostic delay or diagnostic error in these patients can result in several problems, such as drug toxicity due to inappropriate treatments, high drug costs and mortality, early diagnosis is fundamental (9). Galactomannan (GM) is a polysaccharide component of the cell wall of *Aspergillus* species that is released during the growth of hyphae (10). The ability to be detected in body fluids and blood in the early stages of the disease makes it an ideal candidate for the diagnosis of IPA (8). Several studies (8,9,11) have been carried out to evaluate the accuracy of GM in bronchoalveolar lavage fluid (BALF); however, there are still controversies about the optimal cut-off point of BALF GM. The objective of this study was to determine the diagnostic accuracy and the optimal cut-off point of BALF GM of patients with suspected IPA in a tertiary care hospital.

METHODS

STUDY DESIGN AND LOCATION

We conducted a cross-sectional study in a general, tertiary care, university-affiliated hospital with 750 beds. The ethics committee at the hospital has approved access to patient records in December 11th, 2017 (number 170657). Patient confidentiality has been maintained.

PATIENTS AND DATA COLLECTION

All adult patients (≥ 18 years) who underwent a bronchoscopy with BAL between January 2013 and January 2019 due to suspected IPA, and who had BALF tested for GM were included in the study. The BALF sample was collected using a fiber-optic bronchoscope, under standard techniques. The Platelia *Aspergillus* GM Elisa immunoassay (Bio-Rad Laboratories, Marnes-laCoquette, France) was used to detect the presence of GM on BALF, according to the manufacturer's recommendations.

The diagnostic criteria applied for IPA, according to 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) guidelines (12), were: (1) the presence of host factors for IPA, including allogeneic stem cell transplant, solid organ transplantation, connective tissue disorders or use of immunosuppressive agents, such as corticosteroids; (2) the presence of radiological features consistent with IPA on computed tomography, such as dense and well-circumscribed lesions with or without a halo signal, an air crescent sign or cavity; (3) mycological evidence of *Aspergillus*, such as a positive *Aspergillus* culture from qualified specimens (including sputum and BAL) or a positive serum GM (at a cutoff value of 0.5); and (4) histological evidence of *Aspergillus* hyphae on lung biopsy specimens or a positive *Aspergillus* culture from pulmonary biopsy specimens. A proven diagnosis is made when patients meet all four criteria, a probable diagnosis is made when patients meet the first three criteria and a possible diagnosis when patients meet the first two criteria. The studies performed (8,9,11) to assess the accuracy of GM in

BALF (as well as the present study) and using the EORTC/MSG criteria did not include the BALF GM result in the criteria. Therefore, there would be no inclusion of the index test in the reference test. All assessments of the EORTC/MSG criteria were done by two independent investigators who were blinded to the BALF GM results.

A standardized form was completed for each patient with the following information: demographic, clinical, laboratory and radiological data in addition to the EORTC/MSG criteria.

STATISTICAL ANALYSIS

Data analysis was performed using SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) and MedCalc 16.4.3 software package (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Data were presented as number of cases, mean \pm standard deviation (SD), or median with interquartile range (IQR). Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were calculated for 2 of the most used cut-off points (for the optical density index – OD index) for BALF GM (≥ 0.5 and ≥ 1.0). The gold standard was a proven or probable IPA diagnosis by the EORTC/MSG criteria. The absence of disease (IPA) was considered in cases with possible diagnosis or without IPA according to the EORTC/MSG criteria. We also constructed receiver operating characteristic (ROC) curves to analyze the best cut-off point for BALF GM OD index. We excluded from the analysis of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value those patients who had previously used antifungal agents active against *Aspergillus* to avoid false-negative results, and piperacillin-tazobactam and amoxicillin-clavulanate due to the possibility of false-positives. Considering that the sensitivity of BALF GM varies from 70.0% to 87.5% in previous studies (13–15), with a 95% confidence interval and a power of 80%, it will be necessary to include at least 61 patients in the study.

RESULTS

During the study period, 188 patients met the inclusion criteria and were included in the study. According to EORTC/MSG criteria, 35 (18.6%) patients were classified as IPA and 153 (81.4%) patients were classified as non-IPA. The characteristics of the study population are shown in Table 1. The age, gender, underlying diseases/conditions, and prior use of antifungal drugs and antibiotics did not significantly differ between the two groups ($p > 0.05$). Fungal identification, by direct microscopy and culture, was more frequent in IPA group. A higher percentage of patients with dense, well-circumscribed lesion (s) with or without a halo sign on chest CT was found in the IPA group than in the non-IPA group (71.4% vs 38.6%, $p=0.001$). Serum and BALF GM were also higher in the IPA group than in the non-IPA group ($p<0.0001$). The mortality rate was significantly higher in the IPA group as compared with the non-IPA group (54.3 vs 30.1, $p=0.024$).

One hundred and eight patients had previously used antifungal agents active against *Aspergillus* and/or piperacillin-tazobactam and amoxicillin-clavulanate and were excluded from the accuracy analysis. Of the 80 patients included in this analysis, considering the proven or probable diagnosis based on EORTC/MSG criteria as the gold standard, 10 (12.5%) patients were defined as IPA cases and 70 (87.5%) as non-IPA cases (Figure 1). The optimal cut-off point for BALF GM OD index was 0.67, with sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 100% (95%CI 69.2-100.0), 70% (95%CI 57.9-80.4), 32.3% (95%CI 25.0-40.5), and 100% (95%CI 90.9-100.0), respectively. The area under the ROC curve was 0.907 (95% CI 0.82 to 0.96; $p<0.0001$) (Figure 2).

Using a threshold OD index ≥ 0.5 , the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were 100% (95%CI 69.2-100.0), 55.7% (95%CI 43.3-67.6), 24.4% (95%CI 19.9-29.6), and 100% (95%CI 90.9-100.0), respectively, whereas an OD index threshold ≥ 1.0 resulted in a sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 70% (95%CI 34.8-93.3), 81.4% (95%CI 70.3-89.7), 35.0% (95%CI 22.2-50.4), and 95% (95%CI 88.0-98.0), respectively (Table 2).

Table 1. Characteristics of IPA and non-IPA patients.

Characteristics	IPA (n=35)	Non-IPA (n=153)	P value
Age, years	46.9 ± 17.1	46.4 ± 17.7	0.872
Male sex	16 (45.7)	76 (49.7)	0.814
Underlying disease/condition			
Hematologic malignancy	14 (40.0)	71 (46.4)	0.618
Solid organ transplantation	27 (77.1)	131 (85.6)	0.327
HIV	33 (94.3)	121 (79.1)	0.062
Solid organ malignancy	33 (94.3)	141 (92.2)	0.497
Other	29 (82.9)	137 (89.5)	0.202
Prior use of antifungal drugs	19 (54.3)	61 (39.9)	0.172
Prior use of antibiotics*	10 (28.6)	40 (26.1)	0.935
Fungal, direct microscopy	9 (25.7)	5 (3.3)	<0.0001
Fungal, culture	14 (40.0)	3 (2.0)	<0.0001
Neutropenia	13 (37.1)	32 (20.9)	0.070
Corticosteroid therapy	11 (31.4)	26 (17.0)	0.089
Immunosuppressive therapy	26 (74.3)	93 (60.8)	0.193
Allogenic stem cell transplant	9 (25.7)	26 (17.0)	0.340
Chest CT			
Dense, well-circumscribed lesion (s) with or without a halo sign	25 (71.4)	59 (38.6)	0.001
Air-crescent sign	1 (2.9)	3 (2.0)	0.565
Cavity	4 (11.4)	11 (7.2)	0.296
Serum GM	0.45 (0.26-0.96)	0.21 (0.17-0.30)	<0.0001
BALF GM	1.75 (0.68-5.31)	0.40 (0.27-0.77)	<0.0001
Mortality	19 (54.3)	46 (30.1)	0.024

Data are presented as mean ± SD, N (%): number of cases with characteristic (percentage), or median (interquartile range).

* Piperacillin-tazobactam or amoxicillin-clavulanate.

IPA: invasive pulmonary aspergillosis; HIV: human immunodeficiency virus; CT: computed tomography; GM: galactomannan; BALF: bronchoalveolar lavage fluid.

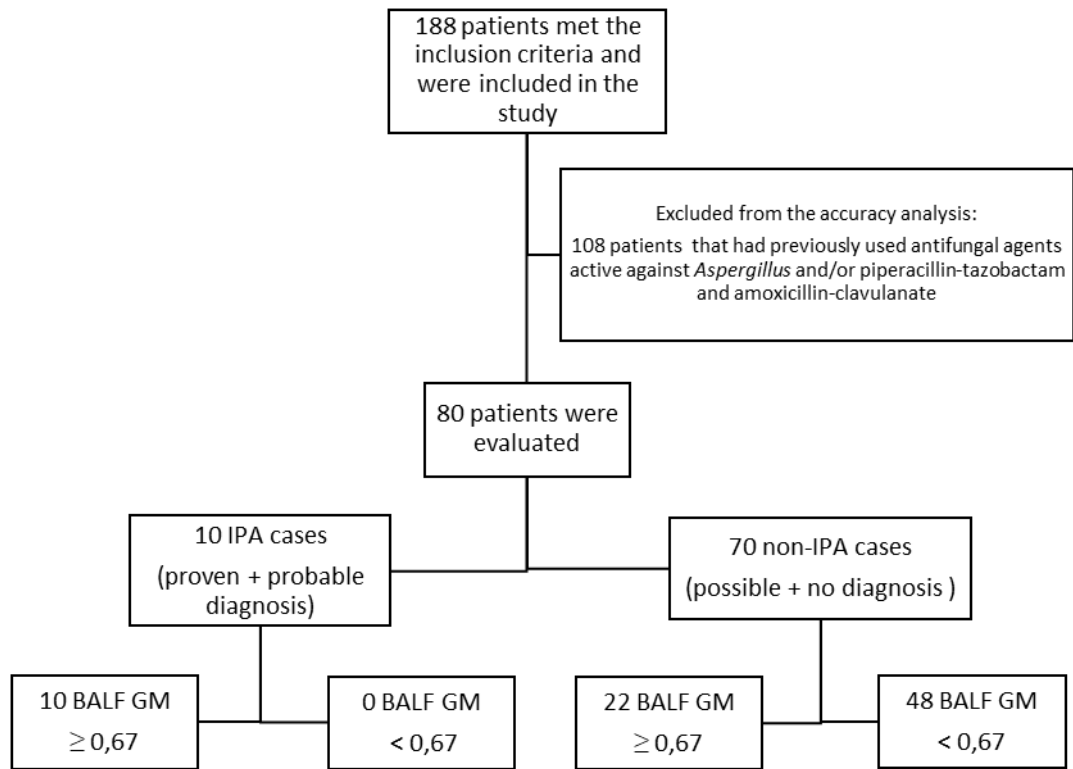


Figure 1. Flow chart of patients included in the study.

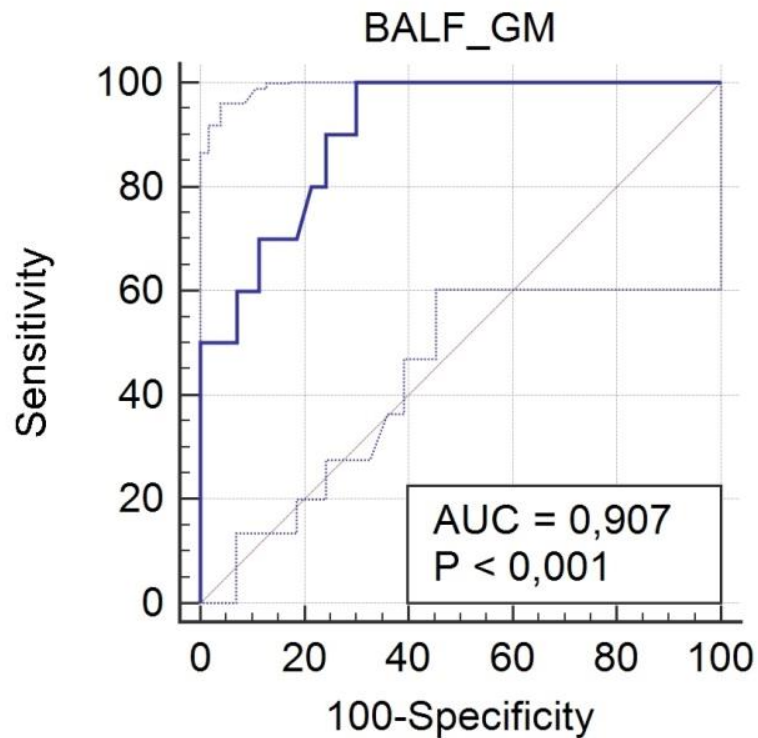


Figure 2. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve for the Detection of IPA with BALF GM test with a OD index cutoff point of 0.67. (The area under the ROC curve was 0.907 [95% CI 0.82 to 0.96; P<0.0001]).

Table 2. Performance of BALF GM for diagnosis of IPA at different cutoff values.

Cutoff value	Sensitivity % (95%CI)	Specificity % (95%CI)	PPV % (95%CI)	NPV % (95%CI)
≥ 0.5	100(69.2-100)	55.7 (43.3-67.6)	24.4 (19.9-29.6)	100 (90.9-100.0)
≥ 0.67	100(69.2-100)	70 (57.9-80.4)	32.3 (25.0-40.5)	100 (90.9-100.0)
≥ 1.0	70 (34.8-93.3)	81.4 (70.3-89.7)	35.0 (22.2-50.4)	95 (88.0-98.0)

BALF: bronchoalveolar lavage fluid, GM: Galactomannan, PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value

DISCUSSION

In the present study, we found that the best cutoff point for BALF GM OD index was ≥ 0.67 , with sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of 100%, 70%, 32.3%, and 100%, respectively. Using a threshold OD index ≥ 0.5 , the sensitivity and negative predictive value were the same, but specificity and positive predictive value were lower (55.7% and 24.4%, respectively). In addition, using an OD index threshold ≥ 1.0 resulted in lower sensitivity and negative predictive value (70% and 95%, respectively) and higher specificity and positive predictive value (81.4% and 35.0%, respectively).

GM is a polysaccharide component in the cell walls of *Aspergillus*, released into body fluids during the early stages of fungal invasion (16,17). BALF GM concentration may be higher than serum GM, being useful for the early diagnosis of IPA (18). It provides additional sensitivity compared to culture, exceeding 70% in most studies (13,19–21). However, the best cutoff point for BALF GM OD index is still under debate. The most common used cutoffs are ≥ 0.5 and ≥ 1.0 , although the results vary widely across studies (22). In the present study, the optimal cutoff point for BALF GM was ≥ 0.67 . Our results stand in accordance with at least two previous studies (9,23). Zhuang et al (23) evaluated the utility of BALF GM in 183 nonneutropenic patients. They found an optimal cutoff value for GM in BALF of 0.76, with a sensitivity of 100% and a specificity of 76.2%. In another study (9) with 128 nonneutropenic patients, the authors identified the best cutoff as 0.7, with lower sensitivity (72.97%) and higher specificity (89.16%). Notably, both studies were conducted in a noneutropenic population. In our study, 62.9% of patients were also nonneutropenic. In the recent years, studies have reported several IPA cases without neutropenia (24,25).

Dense, well-circumscribed lesion(s) with or without a halo sign were statistically more frequent in IPA cases as compared with non-IPA cases in the present study. We also demonstrated that air-crescent sign and the presence of cavities were less common in both groups and they are not statistically different between patients classified as IPA and non-IPA patients. In a previous study with nonneutropenic patients, the authors showed that radiological findings had no significant

difference between proven or probable IPA group and non-IPA group (23). In fact, suggestive lesions of IPA on CT scans, such as the classic halo sign and the air-crescent sign, were less specific in nonneutropenic patients (26,27). We included both neutropenic and nonneutropenic patients in our sample, which justifies the different results.

We found a higher mortality rate in IPA group (54.3%) as compared to non-IPA group (30.1%). IPA is well known to cause high morbidity and mortality. Yu et al (28), investigating nonneutropenic patients, the 30-day mortality rate was higher in IPA patients and almost 4-fold that in non-IPA patients (24.4% vs. 6.6%). In another study (29), the mortality rate of patients treated for IPA was significantly higher than colonized patients (27.3% vs. 9.5%).

This study has some limitations that we have to take into account. First, we recruited patients from a single center. However, we believe the results may apply to other settings. Second, this was a retrospective study, but the information we obtained retrospectively from chart review was as complete as if it was collected prospectively. Last, we included both neutropenic and nonneutropenic patients and maybe some results would be different between these groups; nevertheless, a mixed population reflects the real clinical practice. In spite of these concerns, the definition of the best cutoff value for BALF GM is important to define the best approach for IPA diagnosis, once it depends on the local incidence (22).

In summary, BALF GM detection proved to be a useful adjunct in the early diagnosis of IPA. In our retrospective study, the best cutoff point for BALF GM OD index was ≥ 0.67 , including neutropenic and nonneutropenic patients. Further studies with more homogeneous population are needed to confirm these results.

REFERENCES

1. Zou M, Tang L, Zhao S, Zhao Z, Chen L, Chen P, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive Aspergillosis. *PLoS One*. 2012;7(8).
2. Franquet T, Müller NL, Giménez A, Guembe P, de la Torre J, Bagué S. Spectrum of Pulmonary Aspergillosis: Histologic, Clinical, and Radiologic Findings. *RadioGraphics*. 2013;21(4):825–37.
3. Chabi ML, Goracci A, Roche N, Paugam A, Lupo A, Revel MP. Pulmonary aspergillosis. *Diagn Interv Imaging*. 2015 May;96(5):435–42.
4. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70:270–7.
5. Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Med Wkly*. 2016;146(February):w14281.
6. Desoubreaux G, Bailly E, Chandenier J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. *Med Mal Infect*. 2014;44(3):89–101.
7. Guo YL, Chen YQ, Wang K, Qin SM, Wu C, Kong JL. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: A bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest*. 2010;138(4):817–24.
8. Gupta A, Capoor MR, Shende T, Sharma B, Mohindra R, Suri JC, et al. Comparative evaluation of galactomannan test with bronchoalveolar lavage and serum for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J Lab Physicians*. 2017;9(4):234–8.
9. Zhou W, Zhang Y, Li P, Zhang F, Shi Y, Su X, et al. Diagnostic value of galactomannan antigen test in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples from patients with nonneutropenic invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2153–61.

10. Heng SC, Morrissey O, Chen SCA, Thursky K, Manser RL, Nation RL, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41(1):124–34.
11. Fortún J, Martín-Dávila P, Gomez Garcia de la Pedrosa E, Silva JT, Garcia-Rodríguez J, Benito D, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients. *J Infect.* 2016;72(6):738–44.
12. Donnelly JP. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813–21.
13. D’Haese J, Theunissen K, Vermeulen E, Schoemans H, De Vlieger G, Lammertijn L, et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: Analytical and clinical validity. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1258–63.
14. Schroeder M, Simon M, Katchanov J, Wijaya C, Rohde H, Christner M, et al. Does galactomannan testing increase diagnostic accuracy for IPA in the ICU? A prospective observational study. *Crit Care.* 2016;20(1):1–10.
15. Affolter K, Tamm M, Jahn K, Halter J, Passweg J, Hirsch HH, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage for diagnosing invasive fungal disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(3):309–17.
16. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruellner F, Raggam RB, et al. Performance of Galactomannan, Beta-D-Glucan, Aspergillus Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun 1;52(6):2039–45.
17. Maertens J, Theunissen K, Lodewyck T, Lagrou K, Eldere J Van. Advances in the serological diagnosis of invasive Aspergillus infections in patients with haematological disorders. *Mycoses.* 2007 May;50(s1):2–17.

18. Racil Z, Kocmanova I, Toskova M, Buresova L, Weinbergerova B, Lengerova M, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases—the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis.* 2011 Dec;15(12):e874–81.
19. Husain S, Clancy CJ, Nguyen MH, Swartzentruber S, Leather H, LeMonte AM, et al. Performance characteristics of the platelia Aspergillus enzyme immunoassay for detection of Aspergillus galactomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(12):1760–3.
20. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5517–22.
21. Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar Lavage Fluid Galactomannan for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Hematologic Diseases. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1688–93.
22. de Heer K, Gerritsen Marije G, Visser Caroline E, Leeftang Mariska MG. Galactomannan detection in broncho-alveolar lavage fluid for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;(10):10–3.
23. Zhuang Q, Ma H, Zhang Y, Chen L, Wang L, Zheng L, et al. Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis with Nonneutropenic Patients. *Can Respir J.* 2017;2017.
24. Cai X, Ni W, Wei C, Cui J. Diagnostic Value of the Serum Galactomannan and (1, 3)- β -D-glucan Assays for Invasive Pulmonary Aspergillosis in Non-neutropenic Patients. *Intern Med.* 2014;53(21):2433–7.
25. Dai Z, Zhao H, Cai S, LV Y, Tong W. Invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients with and without underlying disease: A single-centre retrospective analysis of 52 subjects. *Respirology.* 2013 Feb 1;18(2):323–31.

26. Kojima R, Tateishi U, Kami M, Murashige N, Nannya Y, Kusumi E, et al. Chest Computed Tomography of Late Invasive Aspergillosis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2005;
27. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann J-W, Stark P, Durand C, Lortholary O, et al. Imaging Findings in Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis: Clinical Significance of the Halo Sign. *Clin Infect Dis*. 2007 Feb 1;44(3):373–9.
28. Yu Y, Zhu C, Shen H, Liu C, Guo R, Gao Y, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid corrected by urea dilution for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis among nonneutropenic patients. *J Thorac Dis*. 2019;11(2):465–76.
29. Lane M, Szymeczek MA, Sherertz R, Meurtos K, Sciarretta JD, Davis JM. Invasive Pulmonary Aspergillosis: Risks for Acquisition and Death in a Community Hospital. *Surg Infect (Larchmt)*. 2018;19(7):667–71.

6. CONCLUSÕES:

Nesse estudo, o ponto de corte ótimo para galactomana encontrado foi de 0,67(ODI), com sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 100% (95% CI 69,2-100,0), 70% (95% CI 57,9-80,4), 32.3% (95% CI 25,0-40,5), e 100% (95% CI 90,9-100,0), respectivamente. A área sob a curva ROC foi 0,907, o que demonstra a alta acurácia do método, confirmando resultados de estudos prévios.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A aspergilose pulmonar invasiva segue sendo uma doença com alta mortalidade e o diagnóstico precoce é fundamental para evitar retardo no início do tratamento. A galactomanana no LBA provou ser uma ferramenta adjunta útil para o diagnóstico precoce da aspergilose pulmonar invasiva em pacientes neutropênicos e não neutropênicos.