



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**TALITA BIANCHI AIELLO**

**MICOBACTERIOSES E FUNGOS OPORTUNISTAS EM PACIENTES COM  
FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS NO HC UNICAMP**

**CAMPINAS**

**2016**

**TALITA BIANCHI AIELLO**

**MICOBACTERIOSES E FUNGOS OPORTUNISTAS EM PACIENTES COM  
FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS NO HC UNICAMP**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências na área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

**ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO TALITA BIANCHI AIELLO, E ORIENTADO PELO PROF. DR. CARLOS EMILIO LEVY.

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3492/2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ai27m	<p>Aiello, Talita Bianchi, 1990- Micobacterioses e fungos oportunistas em pacientes com fibrose cística atendidos no HC Unicamp / Talita Bianchi Aiello. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.</p> <p>Orientador: Carlos Emilio Levy. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Fibrose cística. 2. Micobactérias não tuberculosas. 3. Fungos. 4. Aspergilose broncopulmonar alérgica. I. Levy, Carlos Emilio, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Mycobacteriosis and opportunistic fungi in cystic fibrosis patients attended at HC Unicamp

**Palavras-chave em inglês:**

Cystic fibrosis

Nontuberculous mycobacteria

Fungi

Allergic bronchopulmonary aspergillosis

**Área de concentração:** Saúde da Criança e do Adolescente

**Titulação:** Mestre em Ciências

**Banca examinadora:**

Carlos Emilio Levy [Orientador]

Marina Buarque de Almeida

Marcelo de Carvalho Ramos

**Data de defesa:** 18-08-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde da Criança e do Adolescente

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**TALITA BIANCHI AIELLO**

---

**Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARLOS EMILIO LEVY**

---

## **MEMBROS:**

- 1. PROF(A). DR(A). CARLOS EMILIO LEVY**
- 2. PROF(A). DR(A). MARINA BUARQUE DE ALMEIDA**
- 3. PROF(A). DR(A). MARCELO DE CARVALHO RAMOS**

---

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca  
examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 18 de agosto de 2016**

*“Mas, senhores, os que madrugam no ler, convém madrugarem também no pensar. Vulgar é o ler, raro o refletir. O saber não está na ciência alheia, que se absorve, mas principalmente, nas idéias próprias, que se geram dos conhecimentos absorvidos, mediante a transmutação, por que passam, no espírito que os assimila. Um sabedor não é armário de sabedoria armazenada, mas transformador reflexivo de aquisições digeridas.”*

- Rui Barbosa

*Aos que me inspiraram e aos que possam vir a se inspirar.*

## AGRADECIMENTOS

“E aprendi que se depende sempre  
De tanta, muita, diferente gente  
Toda pessoa sempre é as marcas  
das lições diárias de outras tantas pessoas.  
É tão bonito quando a gente entende  
Que a gente é tanta gente  
Onde quer que a gente vá.  
É tão bonito quando a gente sente  
Que nunca está sozinho  
Por mais que pense estar...”  
(Caminhos do coração – Gonzaguinha)

Desafio tão grande quanto escrever essa tese, foi transformar sentimentos em palavras. A elaboração de uma tese faz parte de uma trajetória repleta de desafios, incertezas, surpresas e vitórias. Sozinha, seria impossível. Por isso, minha gratidão a todos os que, diretamente ou indiretamente, me ajudaram a trilhar esse caminho até o final.

À Deus, a quem devo minha fé que tanto me ajudou nos momentos de insegurança ao longo desse trabalho.

Aos pacientes e pais de pacientes com fibrose cística atendidos em nosso Ambulatório. Sem sua colaboração e compreensão nada disso seria possível. Não tenho palavras para expressar toda minha gratidão, mas gostaria que soubesse que vocês me inspiravam diariamente e que tudo foi realizado com muita dedicação, pensando em vocês. Desejo o melhor a todos e que o amor e a esperança permaneçam vivos no coração de vocês.

Aos meus pais, Cinira e Rosan, pelo amor incondicional e apoio inigualável, desde sempre. A cada conquista que alcanço em minha vida, mais grata eu me torno por ser filha de vocês e pela honra de ter sido educada por pessoas tão incríveis. Eu só consigo voar, porque vocês me ensinaram o caminho correto... inclusive o de retorno pra casa. Como era bom voltar para casa nos dias mais difíceis dessa jornada! Obrigada por confiarem em mim e em minhas decisões. Tudo o que eu busco realizar é pra vocês, em retribuição a tudo que já me ofereceram.

À minha irmã, Tatiane, outra razão da minha alegria ao voltar pra casa. Obrigada por se orgulhar de mim e sempre estar à disposição para me ajudar com seu conhecimento e suas dicas preciosas. Isso também é pra você, *sís!*

À minha família, avós, primos e tios, pelo interesse que sempre demonstraram ao perguntar “Como está lá em Campinas?” ou “E o mestrado?” ou “E as suas coisas, tudo bem?”. Família é tudo de bom!

Ao meu afilhado, que, mesmo tão pequeno, me ajudou muito. Nos dias difíceis, uma foto ou vídeo com suas fofurices me renovavam.

Ao Mauro, por ser um companheiro de vida excepcional! Talvez você seja a pessoa que mais sabe tudo o que passei durante o desenvolvimento desse trabalho, das incertezas às grandes comemorações. Esteve sempre por perto, mesmo nos dias de chatice e loucura, nunca hesitou em ajudar e, principalmente, não economizou palavras de ânimo e coragem. Muito, muito obrigada.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Emilio Levy, pela oportunidade que me deu, sem ao menos me conhecer, e por acreditar que eu era capaz. Espero ter correspondido às suas primeiras impressões a meu respeito. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e pelas conversas não-acadêmicas. É uma grande alegria ter sido sua aluna.

Aos médicos do ambulatório de fibrose cística do HC Unicamp, em especial, Dr. José Dirceu Ribeiro, Dra. Adyleia Dalbo Toro e Dr. Fernando Antonio Ribeiro, pelo acolhimento no serviço, pelo carinho e pelo apoio constante ao trabalho. Sinto-me honrada pelo convívio com profissionais tão admiráveis como vocês.

À Dra. Ilma Aparecida Paschoal, por sempre se colocar disponível para me esclarecer dúvidas e à Dra. Monica Corso Pereira, por inúmeras vezes ter me acolhido de maneira extremamente generosa. Sou grata às duas pelas contribuições que tanto ajudaram no desenvolvimento desse trabalho. Minha sincera admiração por vocês.

Ao Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva, profissional e ser humano exemplar. Obrigada pelo entusiasmo e por compartilhar um pouco da sua sabedoria em nossas reuniões, sempre produtivas e tranquilizantes.

Ao Renan Marrichi Mauch, pela parceria, muito obrigada. Te desejo sucesso profissional e pessoal.

Aos médicos-residentes da pediatria, pela compreensão com a pesquisa e colaboração, sempre que necessário.

À equipe de enfermagem do ambulatório de pediatria, por toda ajuda que me ofereceram, sempre com boa vontade, e pelas conversas em momentos de descontração.



Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do HC Unicamp por todas as vezes que me ajudaram com explicações específicas e informações de resultados. Em especial, Denise Abonicio e Tania Zaccariotto, por me receberem sempre de forma tão gentil e pelo aprendizado adquirido.

Às funcionárias Daniela e Aline do Laboratório de Imunologia do HC Unicamp, por me ajudarem no processo de separação de alíquotas de soro e pela atenção que sempre me ofereceram.

Aos funcionários da Central de Recepção e Separação de Amostras Divisão de Patologia Clínica do HC Unicamp, em especial Michele, Cristiano e Liliane, pela paciência e pelo bom humor.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico, em especial Karina e Fabricio, por não medirem esforços para me ajudar com os inúmeros prontuários solicitados.

À Marcia Britto, secretária do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da FCM-Unicamp, por todas as dúvidas esclarecidas e informações compartilhadas.

Aos professores Dr. Barros, Dr. André e Dr. Sérgio Marba por todo o conhecimento transmitido nas disciplinas da pós-graduação, que muito contribuíram com meu amadurecimento acadêmico.

Ao dr. Gabriel Franceschi, por permitir que parte dos exames necessários para o andamento da pesquisa fossem realizados no Laboratório Franceschi. Obrigada pela atenção e gentileza.

À Rosangela Mendes, responsável pelo Laboratório de Micologia do Centro Infantil Boldrini, pelo estágio oferecido, onde pude reforçar e aprimorar meus conhecimentos em micologia clínica. Obrigada pela oportunidade.

Aos colegas que fiz ao longo desse período, por entenderem minhas aflições e compartilharem as suas comigo, de modo a me confortar e me fazer perceber que as dificuldades aparecem para todos, mas, com tranquilidade e determinação, sempre são possíveis de se solucionar. Obrigada por isso e pelos momentos de descontração que, merecidamente, desfrutamos juntos. Sucesso a todos vocês.

A Máira Assumpção, que chegou recentemente e já se demonstrou uma pessoa querida e de grande coração. Sou grata pelo tempo que reservou para me ajudar nos dias mais atarefados. Espero poder retribuir sua generosidade.

Aos amigos da vida, que mais uma vez me mostraram o valor da nossa amizade, ao entenderem minha ausência por diversas vezes e nos mais

variados momentos. Obrigada por vibrarem com as minhas conquistas e por acreditarem no meu potencial. É uma alegria tê-los comigo.

À Juliana Modesto e ao Tiago Coutinho, por dividirem não só o teto comigo, mas também as angústias e as vitórias que aconteceram durante esse período em Campinas. Sou grata por todas as vezes que me ofereceram ajuda e demonstraram preocupação com meu estado emocional.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos

À FAEPEX pela concessão de recursos financeiros para realização dos exames laboratoriais externos.

## RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, envolvendo a produção de muco mais espesso e viscoso, devido a um defeito no transporte de água, cloro e sódio nas células epiteliais. Essa alteração resulta em inúmeras manifestações e complicações, destacando-se a doença pulmonar progressiva, que desempenha papel principal na morbidade e mortalidade dos pacientes. O aumento da expectativa de vida desses pacientes permitiu o reconhecimento de uma variedade de outros patógenos, como *Mycobacterium* “não *tuberculosis*” (MNT) e alguns fungos filamentosos, destacando o *Aspergillus fumigatus*, cuja principal manifestação nessa população é a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA). Assim, é crescente o interesse pelo o impacto do *A. fumigatus* em manifestações respiratórias, bem como do relato de recuperação de MNT no trato respiratório de pacientes com FC. O presente trabalho levantou dados atuais de prevalência de micobactérias, fungos oportunistas e ABPA e propôs uma sistematização para investigação laboratorial, acompanhamento e critérios para tratamento de pacientes com risco de infecções por estes agentes, além de identificar as principais espécies isoladas e sua importância clínica nos pacientes atendidos nos ambulatórios de fibrose cística do HC Unicamp. Foram incluídos 117 pacientes que forneceram escarro para análise em cultura microbiológica para micobactérias e fungos, durante o período de março de 2014 a dezembro de 2015. A investigação de ABPA iniciou-se a partir de dosagens de IgE total. Foram encaminhados para exames de sorologia específica, os pacientes que apresentaram IgE  $\geq 500$  UI/ml e/ou apresentaram quadros de exacerbações pulmonares relacionados à presença do *Aspergillus sp.* ou sem resposta a antibioticoterapia. A partir do levantamento dos dados na literatura a respeito da investigação de micobactérias e ABPA na população com FC, foi elaborado um protocolo de busca sistemática desses agentes adaptado ao nosso serviço de referência. Do total de pacientes incluídos no estudo, sete apresentaram pelo menos uma cultura positiva para micobactérias e 80 apresentaram pelo menos uma cultura para fungo oportunista. Das espécies de micobactérias mais isoladas, tivemos complexo *M. abscessus* e *M. avium*, enquanto que *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* foram as

espécies fúngicas com maior isolamento. Oitenta dos 117 pacientes fizeram dosagem de IgE total e 17 realizaram investigação completa para ABPA, entretanto nenhum caso preencheu os critérios diagnósticos propostos por Stevens *et al.* (2003). Diante da ausência de casos de ABPA, procuramos entender outros possíveis significados clínicos do *Aspergillus sp.* em nossa população. Possivelmente, quatro casos configurem sensibilização ao *Aspergillus sp.* e dois podem ser classificados como bronquite por *Aspergillus sp.* Concluímos que a prevalência de MNT foi de 6%, de *Aspergillus sp.* foi de 53% e 29% de *Candida sp.* No período estudado, não foi possível caracterizar nenhum caso de ABPA entre os pacientes investigados. Outros quadros de aspergilose pulmonar, como sensibilização e bronquite por *Aspergillus sp.*, pareceram ser mais frequentes e merecem melhor investigação em nossa população. A implantação de um protocolo de busca sistemática da infecção por MNT e ABPA permitiu conhecer a prevalência e importância desses agentes na FC em nosso meio, bem como sistematizar seu diagnóstico e condutas.

**Palavras-chave:** fibrose cística, micobactérias não tuberculosas, fungos, aspergilose broncopulmonar alérgica

## ABSTRACT

The cystic fibrosis (CF) is genetic disease that involves thick and sticky mucus buildup due to a water, chlorine and sodium conduction malformation in the epithelial cells. This malformation results into several manifestations and complications, highlighting the progressive pulmonary disorders responsible for most morbidity and mortality of patients. The increase of life expectancy for these patients allowed the recognition of many other pathogens such as nontuberculous mycobacteria (NTM) and some filamentous fungi, emphasizing *Aspergillus fumigatus* which main manifestation in these population is Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA). As such, the interest in *A. fumigatus* impact over respiratory manifestations has been increasing as well as recovery reports from CF patients.

In the present study, current data about mycobacteria, opportunistic fungi and ABPA prevalence were gathered and was proposed a systematization for the laboratory investigation, follow-up and criteria for the treatment of CF patients at risk of getting infections by these agents, and also identifying the main isolated species and its clinical importance in patients who were attended at CF outpatient clinic at Unicamp.

It includes 117 patients who provided sputum for the analysis of mycobacteria and fungi microbiological culture from March 2014 to December 2015. The ABPA investigation got started from total IgE levels. The patients who presents either  $IgE \geq 500$  U/ml or clinical manifestations as pulmonary exacerbations related to the presence of *Aspergillus sp.* or no response to antibiotic treatment were forwarded to specific serological tests.

From the review of the literature about mycobacteria investigation and ABPA in the CF population, a protocol of systematics research about these agents was designed and applied to our referral service.

From the total of studied patients, seven presented at least one culture for mycobacteria e and 80 presented at least one culture for opportunistic fungi. *M. abscessus* and *M. avium* complex were the most isolated mycobacteria species and *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* were the most isolated fungi species.

Of the 117 patients, 80 had IgE levels and 17 with clinical data suggesting the possibility of ABPA made a complete investigation of ABPA. However none of these cases meet the diagnostic criteria proposed by Stevens *et al.* (2003). As the result of absence of ABPA cases, we persue to understand other possible clinical meanings about *Aspergillus sp.* into our population. Possibly, four cases set as *Aspergillus* sensitivity and two can be classified as *Aspergillus bronchitis*.

So we conclude that the prevalence was 6% of NTM, 53% of *Aspergillus sp.* and 29% of *Candida sp.* In the studied period, there was no possiblty to characterize a case of ABPA among the patients. Other manifestations of pulmonary aspergilosis, such as sensitivity and *Aspergillus bronchitis* seem to be more frequent and deserve a better investigation of our populations. The implementation of the systematic research protocol for infection by NTM and ABPA enabled to meet the prevalence and importance about these agents in the CF in our medium as well as to systematize its diagnostic and conducts.

**Keywords:** cystic fibrosis, nontuberculous mycobacteria, fungi, allergic bronchopulmonary aspergillosis

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Fibrose cística</b> .....	14
<b>1.2 Micobactérias e FC</b> .....	15
<b>1.3 Fungos e FC</b> .....	17
1.3.1 Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA).....	20
<b>1.4 Justificativa</b> .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1 Geral</b> .....	23
<b>2.2 Objetivos secundários</b> .....	23
<b>3 MÉTODO</b> .....	24
<b>3.1 População, local, período e desenho de estudo</b> .....	24
<b>3.2 Critérios de inclusão e não inclusão</b> .....	24
3.2.1 Investigação de MNT .....	24
3.2.2 Investigação de fungos oportunistas.....	24
3.2.3 Investigação de ABPA .....	25
<b>3.3 Diagnóstico de FC</b> .....	25
<b>3.4 Exames para análise microbiológica do material respiratório</b> .....	25
3.4.1 Análise microbiológica para Micobactérias .....	26
3.4.2 Análise microbiológica para Fungos.....	27
<b>3.5 Exames imunológicos para investigação de ABPA</b> .....	28
3.5.1. Dosagem de IgE total .....	28
3.5.2. Dosagem de IgE e IgG específicas para <i>A. fumigatus</i> .....	28
3.5.3. <i>Prick test</i> ou teste cutâneo.....	29
<b>3.6 Função pulmonar, achados tomográficos e avaliação clínica</b> .....	29
<b>3.7 Protocolo de investigação para micobactérias e abpa na FC</b> .....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	30
<b>4.1 Elaboração do protocolo</b> .....	31
4.1.1 Protocolo de diagnóstico e tratamento das MNT na FC .....	31
4.1.2 Protocolo de investigação, diagnóstico e tratamento da ABPA na FC .....	31
<b>4.2 Micobactérias</b> .....	31
<b>4.3 Fungos</b> .....	34

4.3.1 <i>Aspergillus sp.</i> e outros fungos oportunistas .....	34
4.3.2 ABPA .....	36
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>5.1 Micobactérias</b> .....	<b>41</b>
<b>5.2 Fungos</b> .....	<b>46</b>
5.2.1 <i>Aspergillus sp.</i> e outros fungos oportunistas .....	46
5.2.2 ABPA .....	50
<b>6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b> .....	<b>54</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>63</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FIBROSE CÍSTICA

A fibrose cística (FC), ou mucoviscidose, é uma doença genética, autossômica recessiva, causada pela mutação do gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), localizado no braço longo do cromossomo 7, potencialmente letal e mais comum em caucasianos<sup>1-3</sup>.

O gene CFTR codifica a proteína CFTR, presente principalmente em células epiteliais das vias aéreas, no trato gastrointestinal, nas glândulas sudoríparas e no sistema reprodutor. Essa proteína é responsável por regular o transporte de eletrólitos nas membranas celulares, estando envolvido na regulação do fluxo de cloro (Cl<sup>-</sup>), sódio (Na<sup>+</sup>) e água<sup>2,4</sup>.

Portanto, as mutações no gene podem levar à ausência ou mau funcionamento da CFTR, ocasionando um transporte anômalo de íons cloro e sódio. Como consequência, o paciente portador dessa doença apresenta muco mais espesso e viscoso, podendo obstruir ductos de vários órgãos<sup>5,6</sup>.

Embora seja uma doença multissistêmica, a FC afeta principalmente o sistema respiratório e digestório. Nos pulmões, o muco espesso e viscoso proporciona um ambiente adequado para o crescimento de microrganismos, como bactérias e fungos, resultando em infecções recorrentes, reações inflamatórias e deterioração da função pulmonar<sup>5,7</sup>.

As espécies de bactérias mais comumente associadas com infecção do trato respiratório na FC incluem patógenos humanos comuns, tais como o *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, bem como vários patógenos oportunistas, o mais importante a *Pseudomonas aeruginosa*. Outros oportunistas incluem patógenos hospitalares, tais como *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* e espécies que são apenas ocasionalmente associadas à infecções humanas para além da FC, como o complexo *Burkholderia cepacia*<sup>1,4,8</sup>.

Recentemente, com o aumento da expectativa de vida na FC, além das bactérias, um espectro mais amplo de microrganismos tem sido identificado nas vias aeríferas dos pacientes, como fungos e micobactérias<sup>1,5</sup>.

Apesar dos avanços no atendimento dos pacientes com FC e o aumento acentuado na expectativa de vida durante os últimos anos, a doença pulmonar permanece a principal causa de morbidade e mortalidade para esta população de pacientes, sendo caracterizada por ciclos progressivos de infecção e inflamação, culminando em insuficiência respiratória<sup>1,3,4</sup>.

## 1.2 MICOBACTÉRIAS E FC

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, consideradas patogênicas, e outras denominadas de micobactérias não tuberculosas (MNT) ou micobactérias atípicas, comumente oportunistas<sup>9,10</sup>.

As MNT são encontradas no meio ambiente, em solo e fontes de água, incluindo potável, e podem ser classificadas de acordo com seu crescimento em cultura: de crescimento lento (em sete dias ou mais) ou de crescimento rápido (em menos de sete dias), ou também de acordo com sua capacidade de causar doença no homem, como potencialmente patogênicas e não patogênicas. A doença que ocasionam é denominada de micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia<sup>10,11</sup>.

Infecções por MNT podem causar inúmeras doenças em humanos, principalmente em pacientes imunocomprometidos, que diferem em gravidade e importância em saúde pública<sup>10,11</sup>. Dentre as formas clínicas mais frequentes estão as infecções pulmonares, significativas em pacientes com FC<sup>12</sup>.

Desde 1990, é crescente o número de estudos que relatam a recuperação de MNT a partir do trato respiratório de pacientes com FC<sup>13</sup>, sendo *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium abscessus* as espécies mais comumente isoladas<sup>14</sup>. Esse grupo de indivíduos apresenta maior risco de contrair infecções por MNT do que a população em geral, provavelmente devido a bronquiectasias e infecções crônicas e recorrentes do pulmão<sup>15</sup>, com

uma prevalência considerável da doença, entretanto geograficamente variável<sup>12,16,17</sup> e maior em pacientes mais velhos<sup>18</sup>.

O aumento da prevalência de MNT em pacientes com FC pode estar associado a diversos fatores, principalmente o aumento da sobrevivência desses pacientes, maior vigilância e métodos de diagnóstico mais sofisticados<sup>9,13,19,20</sup>. Independentemente, o potencial patogênico das MNT não pode ser descartado<sup>19</sup>.

Uma variedade de outros microrganismos pode infectar ou colonizar o trato respiratório de pacientes com FC e muitas vezes dificultam a recuperação das MNT, pois normalmente crescem mais rapidamente nas culturas. Na rotina laboratorial, há a necessidade de se seguir um procedimento padrão de descontaminação a fim de minimizar o crescimento excessivo de outros agentes mais comuns, principalmente *P. aeruginosa*<sup>12,13,18</sup>. O protocolo mais utilizado recomenda a descontaminação a partir de N-acetil-L-cisteína com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido oxálico, apesar de recentemente ser detectado que esse método pode ser muito severo e inibir, inclusive, o crescimento das micobactérias<sup>12,14,15</sup>.

Para diagnóstico microbiológico, as amostras coletadas incluem lavado broncoalveolar (LBA), lavado gástrico, biópsias, sangue, urina, porém o melhor material biológico é o escarro. A amostra é submetida, paralelamente, à baciloscopia, por meio da coloração realizada pelo método de Ziehl-Neelsen ou fluorescência, na qual será observada a presença ou ausência de bacilos, e à cultura, em meio líquido e sólido, pois o diagnóstico definitivo requer o crescimento do microrganismo<sup>21</sup>. Em meios líquidos, o crescimento da micobactéria é mais rápido, agilizando, por consequência, a identificação. Hoje, também, já estão disponíveis técnicas mais rápidas e específicas, como a análise molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que visam otimizar o diagnóstico laboratorial<sup>9,14,15</sup>.

A detecção MNT é considerada importante, pois nota-se que geralmente a sua presença está associada a um maior declínio na função pulmonar ao longo do tempo<sup>22</sup>. Por outro lado, o isolamento de MNT em amostras clínicas nem sempre significa uma infecção, pode apenas indicar uma colonização transitória ou contaminação, por isso o diagnóstico deve ser cuidadoso e a

relação entre os achados clínicos e os laboratoriais é de importância fundamental para a decisão de tratamento<sup>10</sup>.

Na tentativa de estabelecer um consenso, a *American Thoracic Society* (ATS) e a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) estabeleceram em 2007 critérios que definem a infecção por MNT. Para fazer um diagnóstico de doença pulmonar por MNT, critérios radiológicos, microbiológicos e clínicos são igualmente importantes e todos devem ser atendidos<sup>23</sup>.

Apesar destes critérios, a definição da doença continua sendo um desafio, principalmente devido à dificuldade de distinguir colonização de infecção<sup>12,13,21</sup>, bem como a sobreposição dos sinais e sintomas atribuídos à FC e à MNT.

### 1.3 FUNGOS E FC

Os fungos são microrganismos considerados cosmopolitas, dispersos no meio ambiente. Estimam-se 250 mil espécies pertencentes a esse grupo, no entanto, em torno de 150 foram descritas como patógenos aos seres humanos. De acordo com o interesse médico, classificam-se sob dois tipos morfológicos: leveduras e fungos filamentosos<sup>24</sup>.

Uma variedade de leveduras e fungos filamentosos é recuperada a partir de culturas de amostras respiratórias de pessoas com FC. Entre as espécies de fungos filamentosos, destaca-se o *Aspergillus fumigatus*, sendo a mais isolada em amostras clínicas<sup>1</sup>, com prevalência que varia de 2 a 58%<sup>25-28</sup>, sendo relativamente incomum em crianças, aumentando progressivamente com a idade<sup>1,29</sup>.

Embora com frequência menor, outras espécies também são isoladas, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus nidulans*<sup>1,29-31</sup>.

Além dos *Aspergillus sp.*, outros fungos podem ser clinicamente relevantes e responsáveis pelo acometimento das vias aéreas, como *Scedosporium apiospermum* e *Exophiala dermatitidis*. A *Candida albicans*, apesar da elevada prevalência, ainda não está bem esclarecida sua importância clínica em pacientes com FC<sup>18</sup>.

Normalmente a colonização das vias aeríferas por fungos filamentosos em FC é secundária à infecções bacterianas (principalmente devido *S. aureus* ou *P. aeruginosa*). Assim, as lesões epiteliais broncoalveolares prévias relacionadas com estas infecções podem ser necessárias para o estabelecimento de fungos no trato respiratório<sup>32</sup>.

A cultura para fungos não é recomendada no monitoramento de rotina dos espécimes de FC, sendo realizada mediante solicitação médica<sup>6</sup>. Para diagnóstico microbiológico, recomenda-se o uso de meios de cultura seletivos para fungos, como ágar Sabouraud<sup>15</sup>. A presença de *P. aeruginosa* na amostra de escarro desses pacientes é comum e pode inibir o crescimento do fungo, portanto o meio é suplementado com antibióticos<sup>4,15,33</sup>.

O significado clínico de isolar fungos filamentosos de secreções respiratórias de pacientes com FC continua a ser uma questão em debate. Estudos recentes mostram claramente que eles causam aumento da morbidade e aumento do número de internações hospitalares, entretanto, a simples presença deste agente não está relacionada à maior deterioração da função pulmonar<sup>7,34,35</sup>.

Técnicas moleculares estão cada vez mais sendo utilizadas para detecção precisa de fungos, mas ainda precisam de maior normatização. A PCR tem maior sensibilidade para detecção de fungos quando em comparada com os métodos de cultura<sup>36, 37</sup>.

As espécies de *Aspergillus* podem se manifestar por diferentes formas clínicas. A classificação das síndromes é útil para o reconhecimento e diagnóstico precoce de aspergilose pulmonar e conduta terapêutica.

A aspergilose pulmonar invasiva está relacionada à neutropenia prolongada e profunda, principal fator de risco para o seu desenvolvimento. Comum em pacientes com câncer e transplantados. Caracteriza-se por invasão da parede brônquica e de vasos sanguíneos, oclusão trombo-micótica e infartos hemorrágicos. A reação inflamatória é mínima, devido à ausência de granulócitos. Hifas são encontradas ao longo das áreas de infarto e no tecido adjacente. Pode ocorrer disseminação hematogênica para outros órgãos, especialmente o cérebro e os órgãos abdominais. Também ocorre em não neutropênicos, incluindo pacientes com imunodeficiências primárias, sendo caracterizada por necrose inflamatória e granulomas<sup>38-40</sup>.

Por outro lado, o aspergiloma refere-se a uma massa fúngica (“bola fúngica”) não invasiva que cresce em cavidades pulmonares, geralmente pré-existentes. Comum em pacientes com antecedentes de tuberculose, doença cuja resolução (com ou sem tratamento) resulta na formação de cavidades. Pode ocorrer em cavitações pulmonares de outra etiologia, como associadas a sarcoidose, como parte de processo bronquiectásico, ou mesmo em cistos brônquicos. Os pacientes costumam apresentar hemoptise, no entanto, podem se manter assintomáticos por anos. A conduta terapêutica mais indicada, quando possível, é a ressecção cirúrgica<sup>38-40</sup>.

A bronquite por *Aspergillus sp.* é de descrição recente e discutível. Trata-se de uma infecção crônica das vias aéreas inferiores, comum mesmo em pacientes imunocompetentes, e pode ser provocada por quaisquer das espécies de *Aspergillus sp.* Não apresenta invasão tecidual importante, destruição do parênquima do pulmão ou resposta alérgica. Os pacientes apresentam carga fúngica elevada, observada em culturas de escarro positivas para *Aspergillus sp.*, sem evidência de reações de hipersensibilidade e, geralmente, os níveis de anticorpos IgG específicos para *Aspergillus sp.* são elevados. O manejo terapêutico pode ser realizado com antifúngico<sup>39,41,42</sup>.

Quando há resposta alérgica, caracterizam-se os quadros de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) ou sensibilização ao *Aspergillus sp.* A ABPA é uma reação de hipersensibilidade aos antígenos de *Aspergillus fumigatus* e é uma complicação reconhecida na FC. Conídios inalados ficam retidos na camada de muco espesso, cobrindo a camada de células epiteliais brônquicas e sua presença contínua estimula a liberação de mediadores inflamatórios. Trata-se de uma resposta celular do tipo Th2, com aumento de eosinófilos e formação de anticorpos IgE e IgG específicos para o antígeno<sup>43-45</sup>. Os pacientes podem ser classificados como sensibilizados ao *Aspergillus sp.* quando os critérios diagnósticos de ABPA não são preenchidos, mas ainda assim há evidência sorológica de hipersensibilidade, sem aparente exacerbação<sup>39,45</sup>.

Por fim, casos onde há a presença do microrganismo em cultura microbiológica, no entanto, com ausência de sintomas clínicos, são classificados como colonização por *Aspergillus sp.* O isolamento do microrganismo em mais de 50% das culturas de escarro durante um ano indica

colonização, embora esse critério apresente limitações e não seja consensual. Essa manifestação requer mais estudos para melhor caracterização<sup>36</sup>.

### 1.3.1 Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA)

A ABPA é uma doença pulmonar de hipersensibilidade, mediada por resposta celular Th2 a partir da germinação dos esporos inalados que liberam antígenos e alérgenos específicos. A resposta Th2 eleva os níveis de anticorpos IgE e IgG, que ativam complemento, produzindo interleucinas<sup>46,47</sup>.

Tosse, chiado, falta de ar e febre baixa são alguns dos sintomas da ABPA. Sintomas semelhantes à rinite alérgica, infiltrados pulmonares, obstrução pulmonar crônica, bronquiectasias, impactação mucóide, hemoptise, eosinofilia, escarro marrom e declínio da função pulmonar também evidenciam ABPA<sup>25,48,49,50</sup>. Assim, o diagnóstico é difícil de ser realizado devido às semelhanças dos achados clínicos característicos da FC e da ABPA<sup>25,36,49</sup>.

Em média, a prevalência de ABPA nessa população varia de 2 a 15%<sup>25,26,28,36,43,48,49,51</sup>. Essa variação pode ser explicada por diversos motivos, como diferentes detalhes técnicos para cultivo, isolamento e identificação, idade, condições climáticas e outros recursos laboratoriais<sup>26,28</sup>.

Além do cultivo destes microrganismos nas secreções respiratórias, técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas, como a PCR. O uso dessas técnicas no diagnóstico de ABPA ainda precisa ser normatizado, mas podem servir de complemento à técnica padrão<sup>36,37</sup>.

Com relação à imunologia, recomenda-se a análise dos níveis séricos de IgE, IgE específica para *A. fumigatus* ou *prick test* e IgG específica para *A. fumigatus*. Dosagens de interleucinas e antígenos recombinantes também têm sido relatados como possíveis biomarcadores<sup>36,47</sup>.

Com a finalidade de definir critérios de diagnóstico para ABPA na FC, em 2003, foi estabelecido um Consenso organizado pela *Cystic Fibrosis Foundation*<sup>52</sup>, sendo determinados critérios clássicos e mínimos.

*Critérios clássicos:*

a. Deterioração clínica aguda ou subaguda (tosse, chiado, intolerância ao exercício, asma induzida pelo exercício, declínio na função pulmonar, aumento da produção de escarro) não atribuídas à outra etiologia.

b. IgE sérica > 1000 UI/ml, exceto se o paciente estiver fazendo uso de corticosteróide sistêmico (neste caso, repetir o teste após a descontinuação do tratamento).

c. Teste de reatividade cutânea imediata positivo para *Aspergillus sp.* (presença de uma pápula endurecida > 3 mm, circundada por halo de eritema, quando o paciente não estiver sendo tratado com anti-histamínicos sistêmicos) ou presença de IgE específica para *A. fumigatus*.

d. Precipitinas contra antígeno *A. fumigatus* ou IgG específica para *A. fumigatus*.

e. Novas ou recentes anormalidades em imagens radiológicas (infiltrados ou impactação mucóide) ou em tomografia computadorizada (TC) de tórax (bronquiectasias) sem resposta ao uso de antibióticos e/ou fisioterapia.

*Critérios mínimos:*

a. Deterioração clínica aguda ou subaguda (tosse, chiado, intolerância ao exercício, asma induzida pelo exercício, declínio na função pulmonar, aumento da produção de escarro) não atribuídas à outra etiologia.

b. IgE sérica > 500 UI/ml, exceto se o paciente estiver fazendo uso de corticosteróide sistêmico (neste caso, repetir o teste após a descontinuação do tratamento). Se houver suspeita de ABPA e o nível de IgE total for entre 200-500 UI/ml, a repetição do teste em 1-3 meses é recomendada.

c. Teste de reatividade cutânea imediata positivo para *Aspergillus sp.* (presença de uma pápula endurecida > 3 mm, circundada por halo de eritema, quando o paciente não estiver sendo tratado com anti-histamínicos sistêmicos) ou presença de IgE específica para *A. fumigatus*.

d. Um dos seguintes: (A) precipitinas contra antígeno *A. fumigatus* ou IgG específica para *A. fumigatus*; ou (B) novas ou recentes anormalidades em imagens radiológicas (infiltrados ou impactação mucóide) ou em TC de tórax (bronquiectasias) sem resposta ao uso de antibióticos e/ou fisioterapia.

Nesse mesmo consenso, também foram propostas sugestões para triagem de ABPA em pacientes com FC: 1) manter alto nível de suspeita de ABPA em pacientes com mais de seis anos de idade; 2) determinar a



concentração de IgE total no soro anualmente. Se a concentração for > 500 UI/ml, determinar reatividade cutânea imediata ao *A. fumigatus* ou usar um ensaio *in vitro* para dosar IgE específica para *A. fumigatus*. Se os resultados forem positivos, considerar o diagnóstico com base nos critérios mínimos; 3) Se a concentração de IgE total no soro for entre 200-500 UI/ml, repetir a dosagem se houver um aumento na suspeita de ABPA, tal como por uma exacerbação da doença e realizar mais testes de diagnóstico (teste cutâneo imediato para *A. fumigatus*, teste *in vitro* de IgE específica para o *A. fumigatus*, precipitinas contra *A. fumigatus* ou IgG específica para *A. fumigatus* e radiografia do tórax)<sup>52</sup>.

Com base nesses critérios, procura-se estabelecer o diagnóstico da ABPA pela soma de achados clínicos, radiológicos, microbiológicos e imunológicos<sup>50</sup>.

O tratamento de ABPA é outro ponto bastante discutido. Por se tratar de uma reação de hipersensibilidade, o tratamento padrão é realizado com corticóides orais, principalmente, prednisona, que inibem resposta inflamatória envolvida na piora do quadro pulmonar. Antifúngicos também são utilizados, principalmente azólicos ou anfotericina B, pois reduzem carga de infecção fúngica, a frequência de exacerbações e melhora da função pulmonar<sup>37,50</sup>. Atualmente, adotou-se o tratamento que associa corticóide e antifúngico<sup>37,43,50</sup>. Estudos apontam possível dependência e resistências a esses medicamentos<sup>36</sup>.

Acredita-se que a colonização de vias aéreas com principais patógenos bacterianos aumenta o risco de ABPA<sup>36,53</sup>. Além disso, há relatos de que a ABPA aumenta as exacerbações e conseqüentemente o número de hospitalizações<sup>37</sup>.

Dessa forma, nota-se que muito há que se investigar e padronizar com relação à interação fúngica com o hospedeiro, especialmente em relação a ABPA, na FC.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Na literatura mundial, é significativo o isolamento de micobactérias e fungos oportunistas em pacientes com FC, em especial adolescentes e adultos, enquanto que desconhecíamos a importância destes agentes em nosso meio, além de não termos protocolos de investigação em nossa rotina de atendimento ambulatorial.

O presente projeto se propôs a levantar dados atuais de prevalência e importância clínica de micobactérias, fungos oportunistas e ABPA nos pacientes atendidos nos ambulatórios de FC do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC Unicamp) Unicamp e elaborar um protocolo de busca sistemática para identificação e seguimento de pacientes com risco de infecções por estes agentes.

Com melhorias na detecção e identificação microbiana de micobactérias e fungos e recursos laboratoriais de resposta imune ao *Aspergillus sp.* é possível fornecer novas estratégias de tratamento e aperfeiçoamento nas medidas de controle de infecção, além de contribuir na redução das hospitalizações desses pacientes diante de um diagnóstico mais preciso.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Investigar a presença e a importância clínica de micobactérias e fungos oportunistas em pacientes atendidos nos ambulatórios de fibrose cística do HC Unicamp.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Identificar as principais micobactérias e fungos oportunistas isolados na população de estudo.

Identificar casos de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) na população de estudo com recursos laboratoriais específicos.

Propor um protocolo de investigação laboratorial, acompanhamento e critérios para tratamento de pacientes com infecções oportunistas por micobactérias e ABPA.

### **3 MÉTODO**

#### **3.1 POPULAÇÃO, LOCAL, PERÍODO E DESENHO DE ESTUDO**

O presente estudo foi realizado com pacientes com diagnóstico de FC, confirmado pelo teste do suor e/ou teste genético, atendidos nos ambulatórios de FC da Pediatria e de Pneumologia de adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC Unicamp), durante o período de 01 de março de 2014 a 31 de dezembro de 2015.

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, transversal.

#### **3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO INCLUSÃO**

##### **3.2.1 Investigação de MNT**

Inclusão: pacientes com idade igual ou superior a seis anos e que coletaram amostra de escarro para cultura de micobactérias.

Não inclusão: pacientes com diagnóstico de FC duvidoso ou que coletaram *swab* de orofaringe para análise microbiológica.

##### **3.2.2 Investigação de fungos oportunistas**

Inclusão: pacientes com idade igual ou superior a seis anos e que coletaram amostra de escarro para análise microbiológica para fungos

Não inclusão: pacientes com diagnóstico de FC duvidoso ou que coletaram *swab* de orofaringe para análise microbiológica.

### **3.2.3 Investigação de ABPA**

Inclusão: pacientes com idade igual ou superior a seis anos e que fizeram dosagem de anticorpo IgE sérico.

Não inclusão: pacientes com diagnóstico de FC duvidoso ou que não fizeram dosagem de anticorpo IgE sérico.

## **3.3 DIAGNÓSTICO DE FC**

A confirmação do diagnóstico de FC baseou-se nos resultados de exames de teste do suor (TS) e/ou estudo genético.

O resultado do TS é considerado positivo quando a concentração de cloro no suor é maior do que 60 mEq/L, sendo necessários, no mínimo, dois testes positivos para que o diagnóstico de FC seja confirmado.

Pelo teste genético, identificam-se as mutações conhecidas como causa de FC em cada um dos genes da CFTR, frente a um contexto clínico ou história familiar compatível. Entretanto, o achado de uma ou de nenhuma mutação no gene da CFTR não exclui o diagnóstico de FC.

Os dados de TS e estudo genético foram coletados nos prontuários médicos dos pacientes e no sistema de consulta de resultados do HC Unicamp.

## **3.4 EXAMES PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO MATERIAL RESPIRATÓRIO**

Para análise microbiológica de micobactérias e fungos, o material biológico recomendado é o escarro, sendo o *swab* de orofaringe inadequado para a investigação laboratorial desses agentes. Por esse motivo, a secreção respiratória foi obtida por meio de expectoração em recipiente universal estéril.

As amostras foram colhidas anualmente e, quando necessário, diante da piora clínica, exacerbações recorrentes ou exame de imagem sugestivo de infecção oportunista.

Os materiais colhidos foram devidamente identificados e refrigerados em caixa apropriada, junto com o pedido adequadamente preenchido e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do HC Unicamp, onde foram submetidos à cultura e identificação microbiológica.

### **3.4.1 Análise microbiológica para Micobactérias**

As amostras de escarro foram encaminhadas para o setor de Micobactérias do laboratório de Microbiologia do HC Unicamp e processadas pelo técnico do laboratório em até 24h após a coleta. Os exames realizados foram baciloscopia, ou pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), e cultura de micobactérias.

#### **Baciloscopia/ Pesquisa de BAAR:**

Esfregaço pela técnica de distensão do escarro para observação microscópica da presença ou não de BAAR, por meio de coloração de Ziehl-Neelsen.

#### **Descontaminação da amostra:**

A fim de eliminar os microrganismos contaminantes que se desenvolvem mais rápido que as micobactérias, impedindo seu crescimento, realizou-se pré-tratamento de todas as amostras de escarro com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 4%.

#### **Cultura de micobactérias em meio líquido (método automatizado):**

Inoculação em um tubo com meio de cultura líquido Middlebrook 7H9, suplementado com solução de antibióticos, incubado no equipamento MGIT® (Becton & Dickinson), por até 42 dias, a 37°C.

#### **Identificação molecular de micobactérias:**

As culturas positivas foram submetidas à extração de DNA para, então, ser realizada a PCR-Multiplex, que consiste em separar o microrganismo isolado em complexo *M. tuberculosis* e MNT. Para identificação das MNT, realizou-se

uma segunda técnica, a PRA-PCR, que identifica as principais espécies desse grupo<sup>54,55</sup>.

### **3.4.2 Análise microbiológica para Fungos**

As amostras de escarro foram encaminhadas para o setor de Micologia do laboratório de Microbiologia do HC Unicamp e processadas pelo técnico do laboratório em até 24h após a coleta. Os exames realizados foram microscopia direta e cultura de fungos.

#### **Microscopia direta de fungos:**

Esfregaço em lâmina para observação microscópica da presença de filamentos e leveduras, sem coloração. Se necessário, utiliza-se clarificante (hidróxido de potássio - KOH).

#### **Cultura de fungos em meio sólido:**

Semeadura em dois tubos de ágar Sabouraud com adição de cloranfenicol e incubação por até 30 dias. Um tubo é incubado em estufa bacteriológica a 35°C e outro a temperatura ambiente.

#### **Identificação de leveduras:**

Prova do tubo germinativo, cultivo em lâmina para prova de filamentação e automação *Yeast* BD® *Phoenix*. Além disso, foram consideradas as características macromorfológicas das colônias, quanto à pureza, coloração, aspecto, superfície e velocidade de crescimento medida em horas ou dias.

#### **Identificação de fungos filamentosos:**

Esfregaço em lâmina com fragmento da colônia para observação de hifas, conídios, conidióforos e esporangióforos, por meio da coloração lactofenol azul-algodão. Em seguida, realiza-se a técnica do microcultivo para estudo mais detalhado das estruturas fúngicas. Além disso, foram consideradas as características macromorfológicas das colônias quanto à sua pureza, tamanho, coloração, aspecto geral, pigmento, superfície, centro, bordas e reverso da colônia.

### 3.5 EXAMES IMUNOLÓGICOS PARA INVESTIGAÇÃO DE ABPA

A investigação de ABPA foi baseada nos critérios estabelecidos pelo Consenso da *Cystic Fibrosis Foundation*<sup>52</sup>.

O *screening* para ABPA foi orientado a partir da dosagem de IgE total dos pacientes. Foram considerados elegíveis à investigação completa de ABPA os pacientes que apresentaram dosagem de IgE total acima ou igual a 500 UI/ml e também aqueles que, apesar de valores abaixo de 500 UI/ml, apresentaram quadros de exacerbações relacionados à presença de *Aspergillus sp.* em cultura de escarro e/ou sem resposta à antibioticoterapia. Para esses pacientes foi colhido sangue para dosagem de anticorpos IgE e IgG específicos para *A. fumigatus* e realizado teste cutâneo (ou *Prick test*).

#### 3.5.1. Dosagem de IgE total

Para dosagem de IgE sérica, foram colhidas amostras de sangue periférico em tubo seco (2-4 ml), para obtenção de soro.

Os materiais colhidos foram devidamente identificados, junto com o pedido adequadamente preenchido, centrifugados e encaminhados ao Laboratório de Imunologia do HC Unicamp, onde foram submetidos à análise sérica de anticorpos IgE pela técnica de nefelometria.

Conforme critério mínimo do Consenso da *Cystic Fibrosis Foundation*<sup>52</sup>, valores maior ou igual a 500 UI/ml foram considerados sugestivos de ABPA.

#### 3.5.2. Dosagem de IgE e IgG específicas para *A. fumigatus*

Uma alíquota do soro obtido para dosagem de IgE total foi separada e armazenada em microtubos sob refrigeração a -80 °C para análise de anticorpos IgE e IgG específicos para *A. fumigatus*. As amostras foram

processadas no Laboratório Franceschi – Medicina Diagnóstica, Campinas-SP, por meio da técnica ImmunoCAP®, no equipamento Phadia 100.

Para IgE específica para *A. fumigatus*, o ponto de corte fornecido pelo Laboratório Franceschi foi de 0,35kUA/L, seguindo a classificação:

Classe 0: < 0,35 kUA/L;

Classe 1: 0,36 a 0,70 kUA/L;

Classe 2: 0,71 a 3,50 kUA/L;

Classe 3: 3,51 a 17,50 kUA/L;

Classe 4: > 17,51 kUA/L.

Para a IgG específica para *A. fumigatus*, o ponto de corte fornecido pelo Laboratório Franceschi foi de 102 mgA/L.

### **3.5.3. Prick test ou teste cutâneo**

Além de teste sorológico, sempre que possível, foi realizado o teste de hipersensibilidade cutânea (*prick test*) para detecção de resposta alérgica ao *Aspergillus fumigatus*.

O teste foi considerado positivo diante da formação de pápula endurecida maior ou igual a 3 mm de diâmetro.

## **3.6 FUNÇÃO PULMONAR, ACHADOS TOMOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA**

Os dados de função pulmonar, achados tomográficos e avaliação clínica foram coletados a partir dos prontuários médicos, no sistema de consulta de exames de imagem do HC Unicamp e/ou durante a consulta ambulatorial.

A função pulmonar dos pacientes foi avaliada por meio da espirometria, realizada no Centro de Investigação Pediátrica (CIPED) e no Departamento de Pneumologia do HC Unicamp. Foram considerados valores de capacidade vital forçada (CVF), volume expirado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) e índice de Tiffenau (VEF<sub>1</sub>/CVF).



A fim de verificar presença de bronquiectasias, impactação mucóide e outras alterações estruturais do pulmão foram analisadas imagens de tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) recentes do paciente, realizadas no HC Unicamp ou em outro serviço médico.

A análise dos exames de imagem e espirometria contaram com a colaboração de docentes dos ambulatórios de Pneumologia e FC pediátrica.

Dados de nutrição, exacerbações, medicações em uso, resposta a antibioticoterapia e co-infecção foram considerados na avaliação clínica dos pacientes incluídos no estudo.

### **3.7 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO PARA MICOBACTÉRIAS E ABPA NA FC**

A partir do levantamento dos dados na literatura a respeito da investigação de micobactérias e ABPA na população com FC, foi elaborado um protocolo de busca sistemática desses agentes adaptado ao nosso serviço de referência.

## **4 RESULTADOS**

Dos 161 pacientes ativos com diagnóstico confirmado de FC e com idade superior a seis anos, 117 colheram amostra de escarro para cultura de micobactérias e fungos durante o período de estudo. Desta população, 62 eram mulheres (53%) e 55 homens (47%). A mediana de idade foi de 20 anos (6 - 80).

Dos 117 pacientes avaliados, sete (6%) apresentaram pelo menos uma cultura para MNT e 80 (68,4%) apresentaram pelo menos uma cultura para fungos.

Para investigação de ABPA, 80 (49,7%) dos 161 pacientes realizaram dosagem de IgE total e foram acompanhados.

## **4.1 ELABORAÇÃO DO PROTOCOLO**

O protocolo elaborado foi apresentado ao corpo clínico do serviço de FC pediátrico e de pneumologia e discutido para, então, ser implantado no serviço, conforme Apêndice 1.

### **4.1.1 Protocolo de diagnóstico e tratamento das MNT na FC**

Após revisão da literatura, verificamos que o documento de Consenso da ATS/IDSA 2007)<sup>23</sup> resumiu de forma objetiva os conhecimentos atualizados sobre critérios, diagnóstico e dificuldades para tratamento de MNT na FC. Assim, a elaboração do protocolo baseou-se nesta publicação.

### **4.1.2 Protocolo de investigação, diagnóstico e tratamento da ABPA na FC**

O último Consenso da CFF (2003)<sup>52</sup> foi o documento que serviu de base para estabelecer os critérios diagnósticos e para tratamento de ABPA na FC no protocolo do nosso serviço, considerando que este documento tem sido utilizado como referencial em relevantes publicações posteriores<sup>36,45,46</sup>.

## **4.2 MICOBACTÉRIAS**

Dos 117 pacientes que coletaram escarro para cultura de micobactérias e foram incluídos no estudo, sete (6%) apresentaram pelo menos uma cultura de amostra do trato respiratório positiva para MNT no período (tabela 1), sendo quatro (57,1%) do sexo masculino, com mediana de idade de 21 anos (9 – 58).

**Tabela 1:** Gênero, idade, IMC, baciloscopia, espécies de MNT isoladas no escarro e conduta terapêutica de pacientes com FC atendidos no Centro de Referência HC Unicamp de janeiro de 2014 a dezembro de 2015.

Caso	Gênero	Idade*	IMC*	Nº de Amostras Positivas	Baciloscopia	Cultura MNT	Tratamento antimicrobiano	Conduta terapêutica
I	F	58	20,8	1	Negativa	<i>M. intracellulare</i>	Não	-
II	M	16	21,1	1	Negativa	<i>M. abscessus</i>	Não	-
III	F	38	22,8	2	Negativa	<i>M. avium</i>	Não	-
IV	F	13	14	2	Negativa	<i>M. abscessus</i>	Sim	Amicacina inalatória + claritromicina oral
V	M	9	12,3	2	Negativa	<i>M. abscessus</i>	Não	-
VI	M	21	26,2	5	Negativa	<i>M. avium</i>	Sim	Etambutol + rifampicina + claritromicina
VII	M	22	18,4	1	Negativa	<i>M. abscessus</i>	Não	-

F: Feminino; M: Masculino; IMC: Índice de Massa Corporal; \*Aferidos próximos do primeiro resultado positivo

**Tabela 2:** Aspectos Clínicos de pacientes com Fibrose Cística com culturas microbiológicas respiratórias positivas para NTM atendidos no Centro de Referência HC Unicamp de janeiro de 2014 a dezembro de 2015.

Caso	Mutação Genética	I.P.	NEP (2009-2013)	NEP (2014-2015)	Macrolídeo	Antibiótico Inalatório	Corticoide Inalatório	Corticoide Sistêmico	Co-infecção	Vacina BCG
I	N/A	Não	5	2	Sim	Não	Sim	Não	N/D	Sim
II	F508del/G542X	Sim	8	6	Sim	Tob/Colistin	Sim	Não	<i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i> / <i>Aspergillus sp.</i>	Sim
III	F508del/3272-26A>G	Não	11	3	Sim	Colistin	Sim	Não	<i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i>	Sim
IV	F508del/-	Sim	2	4	Sim	Tob/Colistin	Sim	Não	<i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i> / CBc	Sim
V	F508del/F508del	Sim	22	10	Sim	Tob	Não	Não	<i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i> / CBc	Sim
VI	F508del/F508del	Sim	2	1	Sim	Tob/Colistin	Sim	Não	<i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i> / <i>Aspergillus sp.</i>	Sim
VII	F508del/-	N/D	7	3	Sim	Tob	Sim	Não	<i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i>	Sim

N/D: não disponível; I.P.: Insuficiência pancreática; NEP: número de exacerbações pulmonares; Tob: Tobramicina; CBc: complexo *Burkholderia cepacia*

Das espécies identificadas, tivemos um paciente com *M. intracellulare*, 2 pacientes com *M. avium* e 4 pacientes com *M. abscessus* (tabela 1). Três pacientes incluídos já apresentavam amostra positiva antes do período estudado. A paciente I teve quatro isolamentos anteriores em 2012 em outro serviço médico, mas sem identificação de espécies e os pacientes III e VI apresentaram uma amostra anterior positiva em 2013 para o mesmo agente.

Além das culturas para micobactérias, seis pacientes apresentavam infecção crônica para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, dois por complexo *B. cepacia* e dois por *Aspergillus sp.* (tabela 2).

Todos os pacientes faziam uso de azitromicina. Apenas a paciente I não faziam uso de antibiótico inalatório e os demais faziam uso de tobramicina ou colistina, por apresentarem cultura positiva para *P. aeruginosa*. Somente o paciente V não fazia uso de corticóide inalatório e nenhum dos sete pacientes fazia uso crônico de corticoterapia sistêmica (tabela 2).

Características funcionais e tomográficas coletadas dos pacientes estão mostradas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

A respeito da função pulmonar, o paciente II é o único que não apresentou alterações. Nos demais, o distúrbio funcional que predominou foi o misto, ou seja, obstrutivo moderado/grave associado à redução de capacidade vital.

**Tabela 3:** Dados de função pulmonar de pacientes com Fibrose Cística com culturas microbiológicas respiratórias positivas para NTM, atendidos no Centro de Referência HC Unicamp de janeiro de 2014 a dezembro de 2015.

Caso	SatO <sub>2</sub> (%)*	VEF <sub>1</sub> (%)*	CVF (%)*	VEF <sub>1</sub> /CVF (%)*
I	97	40	47	68
II	96	82	92	98
III	96	39	57	54
IV	94	30	46	65
V	93	40	46	85
VI	95	65	77	75
VII	99	61	68	79

SatO<sub>2</sub>: Saturação de oxigênio; VEF<sub>1</sub>: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: Capacidade vital forçada; \*Aferidos próximos do primeiro resultado positivo

Pela TC de tórax, percebemos que os achados tomográficos dos sete pacientes foram, de certa forma, homogêneos, destacando a presença de bronquiectasias cilíndricas e císticas, impactação de muco, nódulos centrolobulares e árvore em brotamento.

**Tabela 4:** Aspectos do TCAR de pacientes com Fibrose Cística com culturas microbiológicas respiratórias positivas para NTM, atendidos no Centro de Referência HC Unicamp de janeiro de 2014 a dezembro de 2015.

		Caso I	Caso II	Caso III	Caso IV	Caso V	Caso VI	Caso VII
<b>Bronquiectasia</b>	Cilíndricas	X	X	X	X	X	X	X
	Císticas			X	X	X		
<b>Espessamento da parede brônquica</b>						X	X	
<b>Impactação mucoide</b>			X	X		X		X
<b>Opacidades em vidro fosco</b>		X			X			
<b>Nódulos centrolobulares</b>		X	X		X	X		X
<b>Árvore em brotamento</b>			X		X	X		X
<b>Aprisionamento aéreo</b>			X					X

Dos sete casos analisados, um paciente evoluiu a óbito por evolução da FC, um está em acompanhamento inicial em nosso serviço, três mantêm culturas negativas no acompanhamento ambulatorial e dois estão em tratamento. Um paciente para *M. abscessus*, com amicacina inalatória e claritromicina oral, e outro para *M. avium*, com etambutol, rifampicina e claritromicina (tabela 1).

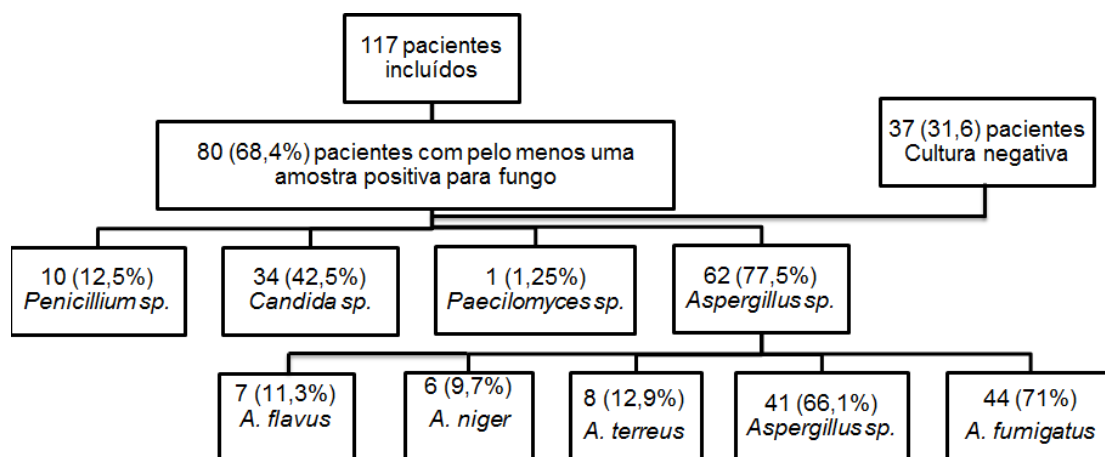
O Apêndice 2 apresenta uma breve descrição clínica dos setes casos analisados.

## 4.3 FUNGOS

### 4.3.1 *Aspergillus sp.* e outros fungos oportunistas

Dos 117 pacientes que coletaram escarro para cultura de fungos e, portanto, foram incluídos no estudo, 80 (68,4%) apresentaram pelo menos uma cultura positiva para fungos durante o período, sendo 42 (52,5%) do sexo feminino e a mediana de idade de 20 anos (6 - 70).

Dentre os pacientes que coletaram amostra de escarro para cultura de fungos, 53% (62/117) apresentaram isolamento de *Aspergillus sp.* e 29% (34/117) de *Candida sp.* Ademais, tivemos dez pacientes com *Penicillium sp.* e um paciente com *Paecilomyces sp.* (fluxograma 1). Trinta e seis pacientes tiveram mais de uma espécie isolada na mesma amostra ou durante o período de estudo (apêndice 3).



**Fluxograma 1:** Distribuição dos gêneros e espécies de fungos isolados em 117 pacientes com FC atendidos no HC Unicamp no período de março de 2014 a dezembro de 2015.

Dos pacientes com cultura positiva para fungos, 77,5% (62/80) apresentaram pelo menos uma amostra positiva para *Aspergillus sp.* e 42,5% (34/80) para *Candida sp.*, sendo estes os gêneros de fungos mais isolados em nossa população.

As espécies de *Candida* identificadas foram *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (tabela 5).

Em relação ao *Aspergillus sp.*, isolamos as espécies *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. flavus* (tabela 6).

**Tabela 5:** Distribuição do isolamento das espécies de *Candida sp.* em pacientes com FC atendidos no HC Unicamp.

Espécie	Nº de amostras	Nº pacientes
<i>Candida sp.</i>	1	1
	2	0
	≥3	0
<i>C. albicans</i>	1	21
	2	5
	≥3	3
<i>C. tropicalis</i>	1	3
	2	0
	≥3	1
<i>C. parapsilosis</i>	1	3
	2	1
	≥3	0
<i>C. dubliniensis</i>	1	3
	2	0
	≥3	0

**Tabela 6:** Distribuição do isolamento das espécies de *Aspergillus sp.* em pacientes com FC atendidos no HC Unicamp.

Espécie	Nº de amostras	Nº pacientes
<i>Aspergillus sp.</i>	1	24
	2	6
	≥3	11
<i>A. fumigatus</i>	1	18
	2	14
	≥3	12
<i>A. terreus</i>	1	7
	2	1
	≥3	0
<i>A. niger</i>	1	6
	2	0
	≥3	0
<i>A. flavus</i>	1	4
	2	3
	≥3	0

#### 4.3.2 ABPA

Dos 161 pacientes avaliados, 80 (49,7%) tiveram ao menos uma dosagem anual de IgE total durante o período estudado. Todos estes foram

incluídos para investigação de ABPA, independentemente de ter resultado positivo na cultura de escarro para *Aspergillus sp.* Quarenta e sete pacientes eram do sexo feminino (58,8%) e a mediana de idade foi de 17 anos (6 – 80).

Dos 80 pacientes avaliados, 18 pacientes apresentaram valores de IgE total entre 250-500 UI/ml e, conforme protocolo proposto, foram acompanhados clinicamente e novo exame foi solicitado. Destes, nove foram investigados com testes específicos por apresentarem quadros de exacerbações. Os demais foram acompanhados, mas não apresentaram manifestações clínicas sugestivas ou não colheram novas amostras no período do estudo.

Quatro pacientes apresentaram valores de IgE total entre 500-1000 UI/ml, preenchendo um dos critérios mínimos para ABPA, mas apenas dois foram investigados laboratorialmente por haver suspeita de ABPA (pacientes 085 e 086), com repetidos quadros de exacerbação.

Três pacientes tiveram IgE total maior ou igual a 1000 UI/ml, valor estabelecido para critério clássico, no entanto dois pacientes eram atópicos e não tinham clínica compatível, por isso não colheram amostra de sangue para os testes específicos. A paciente 049 apresentava quadros de exacerbação, mas tinha diagnóstico de atopia e asma. Realizou o *prick test* com resultado positivo para alérgenos domiciliares e negativo para *A. fumigatus*, afastando-se a hipótese de ABPA, e por essa razão as sorologias específicas não foram realizadas.

Os 55 demais pacientes que apresentaram IgE sérica abaixo de 250 UI/ml continuaram sendo acompanhados ambulatorialmente e, na presença de sinais de exacerbação pelo *Aspergillus fumigatus* e/ou quando não eram responsivos à antibioticoterapia, foram investigados para ABPA.

Os valores de IgE dos pacientes mencionados acima estão reunidos na tabela 7.

O *prick test* foi realizado em 15 (18,75%) dos 80 pacientes com pelo menos uma dosagem de IgE sérica, sendo que somente a paciente 065 teve um teste positivo para *Aspergillus fumigatus*. Para os outros 65 pacientes, o teste não foi realizado por não haver suspeita de ABPA ou por estarem fazendo uso de corticosteróide sistêmico.

A análise de anticorpos IgE e IgG específicos para *A. fumigatus* foi realizada para 17 dos 80 pacientes (tabela 8). Realizaram esta dosagem dois



pacientes com IgE acima de 500 UI/ml; nove pacientes com dosagem entre 250-500 UI/ml, que apresentavam quadro clínico sugestivo; e seis pacientes que, apesar da IgE menor que 250 UI/ml, apresentavam histórico de exacerbações sem resposta à antibióticos e/ou relacionadas à presença do fungo.

Os resultados de IgE específica para *A. fumigatus* foram positivos nos pacientes 002 (2,26 kUA/L – classe 2), 058 (5,23 kUA/L – classe 3) e 077 (1,66 kUA/L – classe 2). Os pacientes 030 e 031 apresentaram dosagem de IgG específica para *A. fumigatus* positiva, com valores de 108 mgA/L e 113 mgA/L, respectivamente (tabela 8).

Nenhum dos 17 pacientes com investigação completa preencheu os critérios mínimos estabelecidos<sup>52</sup> para diagnóstico de ABPA. Apesar disso, a paciente 002 foi tratada para ABPA, considerando piora clínica sem resposta a antibioticoterapia e IgE específica para *A. fumigatus* aumentada. Prescreveu-se itraconazol por seis meses em associação a corticosteróide sistêmico.

Outros nove pacientes receberam tratamento para infecção por *Aspergillus sp.* durante o período de estudo, conforme mostrado na Tabela 9. Em geral, a conduta terapêutica baseou-se nas culturas positivas para *Aspergillus sp.* e nos sinais clínicos, utilizando somente itraconazol por 30 dias e, em algumas ocasiões, o antifúngico foi associado à corticosteróide via oral.

Além do tratamento para infecção pelo *Aspergillus sp.*, a paciente 058 também foi tratado com fluconazol e micostatina, devido ao desenvolvimento de um quadro de mucosite por *Candida albicans* e candidíase no óstio de gastrostomia.

**Tabela 7:** Distribuição dos valores de IgE sérica (UI/ml) de pacientes com FC que apresentaram valores >250UI/ml acompanhados no HC da Unicamp.

		Paciente	Valor (UI/ml)
<b>IgE sérica (UI/ml)</b>	<b>250-500</b>	002	370
		010	455
		013	288
		019	305
		027	494
		030	366
		081	351
		082	462
		043	391
		052	433
		083	431
		052	292
		084	336
		062	442
		071	266
		073	465
		075	459
		077	368
	<b>500-1000</b>	085	701
		086	671
		087	702
		088	917
	<b>&gt;1000</b>	089	2590
		090	1560
		049	1010

**Tabela 8:** Parâmetros laboratoriais de 17 pacientes investigados para ABPA entre 80 em pacientes com FC atendidos no HC Unicamp no período de março de 2014 a dezembro de 2015.

Paciente	IgE total (HC) [UI/ml]	Prick test (HC)	Cultura +		NEP		IgE total (Franceschi) [kU/L]	IgE <i>A. fumigatus</i> [kU/L]	IgG <i>A. fumigatus</i> [mgA/L]
			2014	2015	2014	2015			
082	462	NR	0	0	3	4	499	<0,10 (classe 0)	80,3
002	368	NR	3	3	3	4	497	1,66 (classe 2)	59,6
077	370	NR	2	0	4	1	423	2,26 (classe 2)	101
044	74,4	NR	1	3	2	4	134	<0,10 (classe 0)	80,3
062	442	Neg	2	3	2	3	448	<0,10 (classe 0)	59,8
013	288	NR	3	3	3	3	84,6	<0,10 (classe 0)	14,8
086	671	NR	NR	NR	1	2	739	0,18 (classe 0)	80,7
030	366	NR	0	1	2	1	310	<0,10 (classe 0)	108
035	130	Neg	0	3	1	3	159	0,13 (classe 0)	64
052	433	Neg	5	0	5	5	360	<0,10 (classe 0)	66,5
083	431	NR	0	0	2	1	496	0,17 (classe 0)	15,2
058	137	Neg	1	3	4	5	91,3	5,23 (classe 3)	58
080	59,8	Neg	3	3	3	4	56,8	<0,10 (classe 0)	93,1
065	17,8	Pos	1	5	2	4	25,5	<0,10 (classe 0)	32
031	24,9	NR	6	8	5	6	40,1	0,32 (classe 0)	113
085	701	NR	0	0	2	2	422	<0,10 (classe 0)	5,87
019	305	Neg	3	6	4	7	149	<0,10 (classe 0)	82,3

HC: Hospital de Clínicas da UNICAMP; +: positiva; NEP: número de exacerbações pulmonares; NR: não realizado; Neg: Negativo; Pos: positivo

**Tabela 9:** Pacientes com FC atendidos no HC Unicamp no período de março de 2014 a dezembro de 2015 com quadro pulmonar e tratados com antifúngicos e ou corticosteroides.

Paciente	Início do tratamento	Tratamento
002	mai/2014	Itraconazol por 6m + deflazacorte
077	jul/2014	Itraconazol por 30d
019	jul/2015	Itraconazol por 30d + prednisona
078	jul/2014	Itraconazol por 30d
	dez/2015	Itraconazol por 30d
044	jun/2015	Itraconazol por 21d
080	set/2014	Itraconazol por 30d
058	fev/2014	Itraconazol por 30d + deflazacorte
035	out/2015	Itraconazol por 30d
070	abr/2015	Itraconazol por 30d
008	abr/2014	Itraconazol por 30d
	set/2014	Itraconazol por 28d

d: dias

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 MICOBACTÉRIAS

Há uma grande variação na prevalência de MNT entre os países e centros de referência em FC ao redor do mundo, e a mesma tende a aumentar com o tempo. Nos primeiros nove estudos com MNT na FC iniciados antes de 2000, a mediana das prevalências era de 9% (Amplitude Interquartil – AIQ: 3 – 11%), aumentando para 13% (AIQ: 7 – 17%) nos 10 estudos após 2000<sup>56</sup>. A maioria dos relatos, no entanto, abrange coortes pequenas de pacientes de centros e áreas geográficas específicas. Logo, os resultados são variados e as conclusões são contraditórias<sup>57</sup>. Estudos multicêntricos com casuísticas grandes (maior do que 900 pacientes) mostram uma prevalência que varia de 6,6%, nos Estados Unidos<sup>58</sup> a 13,7%, na França<sup>59</sup>. Em Israel, a prevalência aumentou em quase 3 vezes, de 2003 (5%) para 2011 (14,5%)<sup>60</sup>. O motivo da grande variação entre os valores de prevalência é incerto; porém, alguns fatores possivelmente servem como contribuições, tais como mudanças nas estratégias de vigilância, incremento nas técnicas de cultura microbiológica,

com melhoria no pré-tratamento e descontaminação de amostras respiratórias e melhoria nas técnicas de identificação de micobactérias, transmissão entre pacientes, uso de determinadas medicações que podem modificar a microbiota pulmonar, maior conhecimento desta etiologia entre os médicos e diagnóstico mais frequente de formas não clássicas da FC na fase adulta, as quais podem estar associadas com a infecção por MNT<sup>19,56,57</sup>.

As espécies identificadas nas amostras de escarro dos sete pacientes foram espécies do MAC (*M. avium* e *M. intracellulare*) e MABSC (*M. abscessus*), espécies descritas como mais frequentes nessa população<sup>61</sup>. É sabido que as espécies do MAC são mais frequentes em pacientes mais velhos, ou diagnosticados na fase adulta, enquanto o MABSC é mais frequente em pacientes mais jovens, o que é corroborado por nossos resultados. Historicamente, o MAC é mais frequente do que o MABSC em achados de cultura microbiológica, porém alguns centros, principalmente na Europa e em Israel, relatam um crescimento na proporção do MABSC, até mesmo superando frequência do MAC<sup>13,17,60</sup>. No presente estudo, embora a baixa casuística, a frequência de isolamento destas espécies de MNT foi semelhante.

O envelhecimento da população com FC permitiu maior reconhecimento da MNT como um importante patógeno, no entanto, a sua importância clínica, a decisão para o tratamento e a resposta terapêutica são temas ainda controversos. Por conta da dificuldade na tomada de decisão de tratamento diante do isolamento de MNT, a *American Thoracic Society* (ATS) e a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA)<sup>23</sup> propuseram critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos necessários para definir se um indivíduo tem doença por MNT ou não. Entretanto, tais critérios não são específicos quando aplicados à FC, uma vez que muitos sinais e sintomas propostos se sobrepõem aos característicos da FC. Torna-se, portanto, difícil distinguir se os achados radiológicos associados à presença da MNT são específicos para tal, ou devido à co-existência de outros patógenos, por exemplo, *P. aeruginosa*, ou ainda, à doença primária<sup>13</sup>. Dos sete casos detectados com culturas positivas para MNT, seis apresentavam infecção crônica por *P. aeruginosa* e *S. aureus*, dois por complexo *B. cepacia* e dois por *Aspergillus sp.* O perfil polimicrobiano encontrado nos nossos doentes ilustra bem a dificuldade mencionada de

caracterizar um padrão tomográfico típico de MNT, visto não termos observado nenhuma alteração específica.

Outro aspecto cuja relação ainda é inconclusiva é a associação com uso de medicações como corticóides sistêmicos, antibióticos e macrolídeos. Apesar da ausência de corticoterapia sistêmica, seis pacientes fazem uso de antibiótico inalatório e todos usam corticóide inalado e azitromicina. Há uma atenção particular dada ao papel do uso prolongado de azitromicina como um fator de risco para a aquisição de MNT.

Um estudo caso-controle realizado por Binder *et al.*<sup>16</sup>, comparou casos de MNT e controles ao uso de macrolídeos, sendo azitromicina a mais utilizada (99% para todos os casos de MNT e 98% do grupo controle). Encontraram que pacientes com uso crônico de macrolídeo, por cinco anos ou mais, tiveram menor incidência de MAC ou *M. abscessus*. Utilizando um grande grupo que inclui mais do que 90% da população dos EUA de pacientes com CF, os autores fornecem evidências de que pacientes em uso crônico de azitromicina são significativamente menos propensos a desenvolver infecções por MNT.

Por outro lado, um estudo multicêntrico, transversal, em Israel<sup>62</sup>, mostrou que os pacientes com FC com MNT apresentavam tratamento com azitromicina mais frequentemente comparados com os controles (72% em comparação com 51%, respectivamente). Contudo, neste estudo a utilização de azitromicina e o isolamento de MNT foram analisados concomitantemente, não sendo possível determinar uma associação temporal entre azitromicina e infecção por MNT. Renna *et al.*<sup>63</sup> também verificaram aumento nas taxas anuais de infecção por MNT associado à utilização crônica de azitromicina em um centro de adultos com FC. Por meio de estudos *in vitro* e modelos animais, os autores sugerem que a azitromicina bloqueia a destruição de MNT no interior dos macrófagos. Embora contrastantes, os resultados têm servido para aumentar a consciência das possíveis consequências das terapias de uso comum na FC.

Embora seis dos sete pacientes aqui descritos apresentem alterações funcionais em geral de moderada ou grave intensidade, é difícil atribuir este achado à presença da MNT nas culturas das secreções destes pacientes, uma vez que pacientes com FC cursam com deterioração progressiva da função pulmonar. Na literatura, o impacto funcional da presença de MNT nas culturas de secreções respiratórias não está bem estabelecido.

Radhakrishnan *et al.*<sup>12</sup>, em estudo transversal, quando compararam pacientes com FC com MNT positiva e MNT negativa, não verificaram diferença significativa na média de valores de VEF<sub>1</sub>. Em outro estudo, envolvendo 21 centros nos Estados Unidos, com 12,98% de prevalência de MNT, a média do VEF<sub>1</sub> dos pacientes com FC com MNT positiva foi maior em comparação aos pacientes com MNT negativa (60% vs. 54%)<sup>58</sup>. Em estudo retrospectivo de 10 anos, com 96 pacientes com FC com pelo menos uma cultura positiva para MNT, indivíduos que desenvolveram a doença ativa por MNT mostraram menor VEF<sub>1</sub>% no momento da primeira cultura positiva e queda mais acelerada da FEV1% nos anos subsequentes, em relação a indivíduos com infecção transitória<sup>57</sup>. Os autores sugerem que a baixa função pulmonar e a queda acelerada da função pulmonar podem servir como indicadores da significância de uma cultura positiva inicial para MNT.

A fim de comparar os efeitos da infecção por MAC e MABSC, Qvist *et al.*<sup>64</sup> realizaram estudo avaliando a participação de bactérias Gram negativas e MNT na função pulmonar de pacientes com FC. A infecção por MAC não mostrou impacto significativo, porém, a infecção por MABSC teve o maior impacto na aceleração do declínio do VEF<sub>1</sub>, com uma taxa de -2,2% ao ano. Além disso, o tratamento da infecção esteve associado com uma redução na taxa de declínio do VEF<sub>1</sub>, evidenciando, pela primeira vez, que a infecção por MABSC pode, de fato, levar à deterioração da função pulmonar, a qual pode ser atenuada por tratamento da infecção.

Dos sete casos analisados, dois estão em tratamento, um evoluiu para óbito pela evolução da doença pulmonar relacionada à FC, um está em acompanhamento inicial e três mantém culturas negativas no acompanhamento ambulatorial, estes, portanto, não considerados importantes clinicamente. Destaca-se que o achado laboratorial de uma única cultura positiva para MNT não é adequado para estabelecer doença oportunista e necessidade de erradicação<sup>65</sup>.

O monitoramento longitudinal e múltiplas culturas são necessários para definir o diagnóstico de doença pulmonar por MNT. A decisão de tratar deve equilibrar os riscos e benefícios do tratamento, incluindo, efeitos adversos, tolerância à medicação, aceitação do paciente, metas da terapia e comorbidades<sup>66</sup>.

As condições climáticas e geográficas de determinadas regiões são consideradas possíveis razões para a variação da prevalência de MNT. Em um estudo<sup>67</sup> envolvendo 2,3 milhões de indivíduos adultos nos Estados Unidos, nas quais houve prevalência significativamente aumentada de casos de MNT, uma série de fatores geoclimáticos implicaram em maior risco para aquisição da infecção por micobactérias, tais como altos níveis de precipitação e evapotranspiração diária, menor altitude, maior densidade populacional e características químicas do solo. Nessas áreas, o risco relativo de diagnóstico de prevalência de MNT variou de 1.9 a 6.5, em comparação com todas as outras áreas estudadas. Em outro estudo<sup>68</sup>, o maior fator preditivo de MNT foi a umidade do ar saturado associada com a região de residência do paciente, o que está diretamente correlacionado com altas temperaturas. Isso pode levar à formação de aerossóis circulantes no ar, que podem abrigar MNT, causando um maior risco de aspiração dessas bactérias.

Em um estudo com pacientes atendidos em um centro de referência do Rio de Janeiro, local com umidade do ar mais elevada do que nosso centro (localizado no estado de São Paulo) houve isolamento de MNT em 10 de 129 crianças (7,75%), uma taxa discretamente maior do que a encontrada por nós no presente estudo<sup>69</sup>. Apesar da pequena diferença, o resultado é coerente com as associações entre condições geoclimáticas e maior risco de aquisição de MNT, uma vez que o Rio de Janeiro é um local com maior temperatura, umidade relativa do ar e densidade populacional em relação à região de Campinas, onde está localizado nosso centro. O Brasil é um país conhecido por sua enorme diversidade de condições climáticas e de vegetação, além de grandes contrastes sociais e variações na densidade populacional. Porém, até onde conhecemos, não há estudos comparando a prevalência de patógenos na FC de acordo com essas condições. Também não há estudos comparando tais características entre diferentes países. Investigar essas diferenças pode facilitar o entendimento da variação da prevalência de MNT relatada na literatura.

Outra possível razão para a prevalência reduzida de MNT em nosso meio é a administração sistemática da vacina BCG no Brasil. Enquanto nos Estados Unidos, Canadá e em muitos países da Europa, essa vacina não é recomendada, ou recomendada apenas para crianças maiores e/ou em grupos



de risco, no Brasil, ela é rotina para neonatos e aplicada em dose única como medidas de controle e proteção para manifestações graves da primo-infecção por *M. tuberculosis*, como a tuberculose miliar e a meningite tuberculosa<sup>70,71</sup>.

O desenvolvimento da imunidade contra *M. tuberculosis* já na primeira infância pode proteger o paciente contra as demais micobactérias, considerando que a imunidade que o indivíduo desenvolve com o uso da BCG não é específica para a *M. tuberculosis*<sup>72</sup>.

Em estudo realizado na Suécia, observou-se que o número de isolamentos de micobactérias em pacientes nascidos após a suspensão do uso da BCG no país aumentou significativamente, indicando que a vacinação com BCG pode induzir imunidade à doença por micobactérias atípicas em humanos<sup>73</sup>.

Corroborando o poder imunogênico da imunização com micobactérias, a OMS recomenda o uso da *M. vaccae* inativada como agente imunoterapêutico. Segundo Yang *et al.*<sup>74</sup> há evidência de bons resultados em pacientes submetidos a esse tratamento, que apresentam conversão da cultura de escarro e melhoria na aparência radiológica.

Uma característica peculiar na BCG distribuída no Brasil é que a mesma cepa é utilizada desde a sua chegada ao país, conhecida como cepa Moreau. Estudos mostram que cepas mais antigas são mais imunogênicas e podem conferir uma melhor proteção contra a tuberculose<sup>72,75</sup>. Pela mesma razão, é possível que a nossa vacina também ofereça efeito protetor contra MNT. Desconhecemos a existência de estudos avaliando o impacto dessa vacina na prevalência de MNT entre pacientes com FC.

## **5.2 FUNGOS**

### **5.2.1 *Aspergillus sp.* e outros fungos oportunistas**

Com o aumento da expectativa de vida dos pacientes com FC, tornou-se necessário entender o papel patogênico dos fungos nas vias aeríferas. O isolamento de fungos ambientais em material respiratório desses pacientes têm

se tornado cada vez mais frequente, porém a relevância clínica, impacto na função pulmonar e prognóstico relacionado a estes isolamentos ainda não é claro. Em nosso serviço, a prevalência de fungos encontrada foi de 68,4%.

Um dos grupos mais frequentes em amostras do trato respiratório de pacientes com FC são as espécies de *Candida*, sendo a *C. albicans* considerada a segunda espécie fúngica mais frequente nessa população. *Candida sp.* foi isolada em 27,3% dos pacientes analisados e em 24,8% destes tratava-se de *Candida albicans*. Nos 80 pacientes com cultura positiva para fungos, o isolamento de *Candida sp.* ocorreu em 40% e de *C. albicans* em 36,25%, sendo a espécie leveduriforme mais isolada em nossa população de estudo, concordando com a literatura<sup>33,36</sup>.

A partir de dados levantados em oito centros de FC e laboratórios de micologia do Reino Unido e França, Borman *et al.*<sup>76</sup> observaram que *C. albicans* foi a levedura isolada predominante em todos os centros participantes do estudo, representando mais de 60% de todas as espécies de *Candida* recuperadas (68,4-100%). O isolamento ocorreu pelo menos uma vez em, aproximadamente, 50% dos pacientes, independentemente do centro de estudo em questão (47,8-72,4%). A frequência de *C. albicans* em material respiratório de pacientes com FC também foi avaliada no estudo observacional e prospectivo realizado por Chotirmall *et al.*<sup>77</sup>, onde 89 pacientes foram acompanhados durante o período de janeiro de 1998 e dezembro de 2008. Os autores observaram que em torno de dois terços dos pacientes (n= 54, 60,7%) apresentaram uma cultura positiva para *C. albicans* no período estudado. Nossos achados também são corroborados pelo estudo realizado na Alemanha que avaliou, de forma prospectiva, 56 pacientes com FC ao longo de 30 meses. Os resultados obtidos revelaram que *C. albicans* foi isolada a partir do trato respiratório em 93% dos pacientes, enquanto outras espécies de *Candida* foram recuperadas de 20% destes indivíduos<sup>78</sup>.

Apesar de frequentes, a importância clínica das *Candida sp.* é controversa. Por um longo período, foram consideradas apenas contaminação nas amostras respiratórias, por fazerem parte da microbiota oral, no entanto seu crescente reconhecimento nas vias aeríferas de pacientes com FC tem se tornado motivo de maiores questionamentos.

Com frequência, pacientes com FC fazem uso de corticóides orais ou inalatórios, o que possivelmente aumenta a probabilidade de recuperação de *Candida sp.* nas culturas de escarro, amostras que passam pela cavidade oral para serem colhidas. Além do uso de corticóides orais e inalatórios, outros possíveis fatores de risco que contribuem para o achado deste agente incluem exposição recorrente aos antibióticos, principalmente contra *P. aeruginosa* e diabetes relacionada à FC. Ainda assim, o potencial patogênico das espécies de *Candida* permanecem pouco explorado<sup>29,77</sup>.

Por outro lado, sabe-se que o gênero mais comum isolado na FC é o *Aspergillus sp.*, fungo capaz de desempenhar papel patogênico, e envolvido em um espectro de doenças denominadas aspergilose, cujas manifestações são principalmente pulmonares e raramente disseminadas. A principal espécie isolada nos pacientes com FC é o *A. fumigatus*, com taxas de prevalência variando de 6% a cerca de 60%<sup>1,29,36,79</sup>.

A maioria dos estudos em que a prevalência de *Aspergillus sp.* é estratificada por idade indicou que a infecção é relativamente incomum em crianças pequenas e aumenta progressivamente com a idade<sup>1,29</sup>. Em nosso estudo, a mediana de idade dos 62 pacientes com amostra positiva para *Aspergillus sp.* foi de 19 anos (6 - 70). Um dos fatores que podem explicar a baixa prevalência em crianças é a dificuldade em colher amostras representativas para cultura, pois em geral são colhidos *swab* do “pescado” de secreção orofaríngea, que compromete o isolamento microbiológico desse agente. Em nosso serviço, parte das crianças atendidas não conseguem expectorar e, por isso, utilizamos o recurso da coleta com *swab*. Esse fator pode subestimar alguns casos de isolamento de fungos em material respiratório.

Esta ampla variação nas frequências de isolamento pode estar relacionada à idade dos pacientes estudados, porém, mais provavelmente, às diferenças nos métodos de cultura microbiológica, bem como diferentes modos de coleta de material. Alguns estudos sugerem a utilização de meios seletivos para melhor isolamento de fungos, assim como meios com adição de antibióticos para inibir o crescimento de bactérias, uma vez que as amostras respiratórias de pacientes com FC costumam apresentar, com frequência, *P.*

*aeruginosa* e *S. aureus*<sup>33,80</sup>. Entretanto, não existe método padronizado para exame micológico de amostras da FC adotado até o momento.

No estudo de Borman *et al.*<sup>76</sup>, os autores se propuseram a avaliar a potencial contribuição dos métodos micológicos empregados para examinar secreções respiratórias da FC em relação à variabilidade fúngica relatada. Identificaram que o fato de técnicas diferentes serem aplicadas em diferentes laboratórios pode refletir diretamente na variação da prevalência desses agentes, em especial, do *A. fumigatus*. Esse assunto também foi abordado em reunião sobre "Infecções respiratórias fúngicas na fibrose cística", organizada pela *International Society for Human and Animal Mycology* (ISHAM), em 2009, na França, com a presença de médicos, micologistas e cientistas de 14 países diferentes. As taxas de isolamentos das principais espécies de fungos na FC foram apresentadas, incluindo dados de pacientes da França, Espanha, Itália, Dinamarca, Reino Unido e Brasil. Os envolvidos concordaram que, em partes, as variações (11,1% na Espanha a 81% na Dinamarca) se davam pelas diferenças nos métodos de cultura utilizados, incluindo volume das amostras, a natureza e número de meios de cultura e temperatura e duração de incubação<sup>7</sup>. Uma abordagem de colaboração multicêntrica para definir um método padronizado de análise das amostras respiratórias de pacientes com FC é necessária, na tentativa de avaliar com melhor precisão a prevalência desses agentes e o seu papel nas exacerbações.

A implantação de técnicas moleculares também é recomendada por alguns autores, em associação à rotina microbiológica padrão<sup>76</sup>. Em estudo realizado por Nagano *et al.*<sup>33</sup>, todas as amostras negativas em primeira análise, por método de cultura microbiana, apresentaram resultados positivos para fungos após a análise por PCR, registrando maior sensibilidade da técnica. No entanto, pela elevada sensibilidade das técnicas moleculares e a presença comum do *Aspergillus sp.* como contaminante ambiental, existe o potencial risco de resultados falso-positivos.

Além dos *Aspergillus sp.*, outras espécies de fungos filamentosos também são relatadas na literatura. *Exophiala dermatitidis* e *Scedosporium sp.* estão cada vez mais sendo reconhecidas como patógenos na FC<sup>1,29</sup>, entretanto as espécies não foram isoladas em nossa casuística. *Penicillium sp.* e

*Paecilomyces sp.* foram outras espécies de fungos filamentosos isoladas em nossos pacientes, mas sem relevância clínica atribuída a esses agentes<sup>36,76</sup>.

### 5.2.2 ABPA

Em nosso estudo, nenhum paciente teve diagnóstico de ABPA estabelecido conforme os critérios atualmente aceitos<sup>52</sup>. Isto está em desacordo com a literatura, que vem demonstrando frequências mais elevadas de ABPA nos pacientes com FC.

Chotirmall *et al.*<sup>81</sup> e Mortensen *et al.*<sup>82</sup>, em estudos prospectivos realizados na Irlanda e Dinamarca, respectivamente, avaliaram a prevalência de ABPA em pacientes adultos atendidos em seus centros de referência em FC. A taxa encontrada pelos irlandeses foi de 12% (6/50), enquanto que o estudo dinamarquês detectou 8,3% de ABPA. A partir de um estudo retrospectivo realizado com uma população de crianças atendidas em um centro de referência pediátrico em FC na França (em média, seis anos de seguimento), os autores observaram que oito pacientes em 85 analisados apresentaram ABPA, configurando 9% de prevalência<sup>53</sup>. Outro estudo francês, no entanto prospectivo e realizado em outro hospital, identificou quatro casos de ABPA em 117 crianças (3,4%) avaliadas durante o período de janeiro de 1995 a julho de 2007<sup>83</sup>. Noni *et al.*<sup>84</sup>, em estudo retrospectivo com 121 crianças realizado na Grécia, e Sharma *et al.*<sup>85</sup>, em estudo prospectivo com 41 crianças realizado na Índia, apresentaram prevalência de aproximadamente 15% de ABPA, percentual mais elevado encontrado nas publicações recentes. Todos os estudos utilizaram os critérios da CFF para orientar e determinar o diagnóstico de ABPA.

No Brasil, apenas dois trabalhos a respeito de ABPA na FC foram encontrados. O primeiro foi realizado entre junho e outubro de 2001, por Almeida *et al.*<sup>86</sup> em São Paulo. O estudo foi prospectivo e avaliou 32 pacientes, sendo que dois casos foram considerados ABPA (6%) com base nos critérios da CFF. O segundo, também prospectivo, foi realizado na Bahia, de dezembro de 2003 a março de 2005. Carneiro *et al.*<sup>87</sup> acompanharam 74 pacientes e dois

casos foram definidos como ABPA (3%), no entanto os autores adaptaram os critérios diagnósticos baseados em mais de uma publicação.

Apesar da associação de ABPA com FC ter recebido atenção especial, o seu reconhecimento permanece um desafio devido à sobreposição dos sintomas e sua semelhança de apresentação clínica ao de uma exacerbação infecciosa bacteriana<sup>46,88</sup>. Considerando os critérios da CFF, o diagnóstico de ABPA depende de aspectos clínicos, laboratoriais e de imagem. Os critérios mínimos contemplam piora respiratória aguda ou subaguda não atribuída a outra etiologia; IgE total maior ou igual a 500 UI/ml; *prick test* com endureção acima de 3 mm ou anticorpo IgE para *A. fumigatus* positivo; e pelo menos um dos seguintes: anticorpo IgG para *A. fumigatus* positivo e/ou nova anormalidade observada na radiografia ou TC de tórax<sup>52</sup>. Os achados radiológicos são os mais difíceis de determinar em pacientes com FC, uma vez que a TC, na maioria dos casos, já apresenta alterações estruturais importantes devido à doença de base<sup>81</sup>. Por isso, é importante manter um alto nível de suspeita clínica e, quando necessário, realizar a investigação para ABPA.

Em relação à IgE sérica, parâmetro pelo qual orientamos a nossa investigação de ABPA, podemos afirmar que sua dosagem reflete uma maior sensibilização a qualquer alérgeno, de modo que pode ser elevada devido à atopia em si, ao invés de ABPA. Os valores propostos como critérios mínimos (>500 UI/ml) e clássicos (>1000 UI/ml) foram pouco detectados em nossa população de estudo e, em sua maioria, estavam relacionados à pacientes atópicos. Apesar de suas limitações, a IgE total ainda é considerada uma ferramenta importante para o diagnóstico de ABPA na FC<sup>46</sup>. Entretanto, por não se tratar de um exame específico (visto que outros processos alérgicos e verminoses também são investigadas por esse parâmetro laboratorial), acreditamos que a exigência de IgE total para a definição de ABPA deveria ser abordada de forma crítica.

A dificuldade de preencher os critérios propostos pela reunião de consenso da CFF permitiu que algumas pesquisas fossem realizadas a fim de determinar outros potenciais biomarcadores para ABPA, como antígenos recombinantes do *Aspergillus* (*rAsp*), quimiocina regulada pelo timo e pela ativação (TARC), basófilos CD203c, real-time PCR (RT-PCR) direto do material

respiratório e galactomanana<sup>28,47,49,89,90</sup>. Esses marcadores mais recentes exigem validação antes de ser considerado um avanço significativo sobre os testes atualmente disponíveis<sup>36,45</sup>.

Apesar de a ABPA ser relatada como a manifestação mais comum do *Aspergillus sp.* na FC, não encontramos nenhum caso da doença em nossos pacientes, baseados nos critérios da CFF. A paciente 002, embora não preenchesse todos os critérios, possivelmente apresentou um quadro que se classificaria como ABPA, considerando que ela apresentou dosagem e IgE entre 250-500 UI/ml, IgE específica para *A. fumigatus* classe 2 e clínica compatível, e, por essa razão, foi a única paciente que recebeu tratamento para ABPA durante o período da pesquisa. A paciente apresentava, também, histórico de alergia alimentar e fazia uso frequente de corticoide sistêmico, o que pode ter interferido na manifestação da ABPA.

Talvez uma melhor estratégia para a pesquisa ativa de ABPA seria partir da coleta de IgE total e testes específicos quando houver piora clínica-laboratorial aguda ou sub-aguda pouco responsiva ao tratamento com antibióticos ou no surgimento de novas anormalidades nos exames de imagem, ao invés do monitoramento anual com IgE total, conforme inicialmente proposto pelo nosso protocolo. A coleta anual não orientada por manifestações clínicas e/ou radiológicas pode ter sido um fator responsável pela ausência de diagnósticos de ABPA na população estudada.

O fato de não encontrarmos nenhum caso de ABPA, nos motivou a buscar outras possíveis manifestações do *Aspergillus sp.* que pudessem ser reconhecidas em nosso serviço.

Com base nos resultados obtidos, observamos que dois pacientes (030 e 031) possivelmente se enquadram nos critérios de bronquite por *Aspergillus sp.*, apresentando presença do fungo em cultura microbiológica e níveis de IgG específicos para *A. fumigatus* elevados (>102mgA/L), além de IgE total e específica para *A. fumigatus* dentro dos padrões de normalidade. A bronquite por *Aspergillus sp.* é uma classificação recente e discutível. Shoseyov *et al.*<sup>91</sup> sugeriram essa classificação em estudo onde relataram seis pacientes com FC e crescimento de *A. fumigatus* em culturas de escarro, agravamento da doença respiratória e que não respondiam à terapia padrão com antibióticos. Os pacientes analisados preencheram apenas alguns dos critérios reconhecidos

para o diagnóstico da ABPA e, além disso, responderam ao tratamento exclusivo com antifúngico, não recomendado na ABPA. Para definir melhor os critérios diagnósticos de bronquite por *Aspergillus sp.*, Baxter *et al.*<sup>28</sup> realizaram um estudo que propõe a utilização de galactomanana e RT-PCR como biomarcadores, além dos recursos sorológicos de resposta imune ao *Aspergillus sp.* Segundo os autores, o quadro clínico se caracteriza por exacerbações respiratórias decorrentes de processo infeccioso, não alérgico, sem resposta aos antibióticos, porém responsivo ao uso de antifúngicos. Do ponto de vista laboratorial estes pacientes teriam elevada carga fúngica no escarro, RT-PCR positivo no escarro, galactomanana sérica positiva e IgG específica para *A. fumigatus* positiva. Para que possamos afirmar o diagnóstico desses dois pacientes, precisamos realizar os demais testes propostos pela literatura.

Outro tipo de manifestação por *Aspergillus sp.*, cuja prevalência parece variar entre 20 a 65% da população, é a sensibilização ao *Aspergillus sp.*, considerada não infecciosa e com base imunoalérgica, caracterizada pela positividade imediata do teste cutâneo ao *A. fumigatus* ou elevação dos anticorpos IgE específicos para *A. fumigatus*. Tanto para sensibilização ao *Aspergillus sp.* como para ABPA, não é necessário o isolamento do microrganismo em amostras respiratórias, e a diferenciação laboratorial das duas manifestações se baseia na positividade da IgG para *A. fumigatus* nos casos de ABPA<sup>48, 92</sup>. Dos nossos pacientes, quatro podem ser classificados como sensibilização ao *Aspergillus sp.*, considerando que apresentaram IgE específica elevada (pacientes 002, 058 e 077) ou *prick test* positivo (paciente 065), e os demais critérios para ABPA negativos.

Nenhum paciente foi classificado com aspergilose pulmonar invasiva, pois não se tratavam de pacientes imunocomprometidos e não foram observados sinais de invasão do fungo, nem como aspergiloma, justificado pela ausência de evidência tomográfica de bola fúngica.

Tivemos 27 pacientes (33,7%) classificados como colonizados por *Aspergillus sp.*, considerando que no período do estudo realizaram dosagem de IgE com resultados dentro dos parâmetros de normalidade e apresentaram culturas positivas para espécies do gênero *Aspergillus*. Estes pacientes não foram investigados para ABPA por não apresentarem sintomas ou sinais



sugestivos. Os demais pacientes com cultura positiva para *Aspergillus sp.*, sem dosagem de IgE total, não foram classificados por falta de parâmetros.

Por fim, em relação aos tratamentos prescritos a dez pacientes, destaca-se o uso de itraconazol em sete casos. A conduta terapêutica, em sua maioria, se baseou na piora clínica do paciente e na presença de *Aspergillus sp.* em culturas prévias, visto que exames específicos não estavam disponíveis na oportunidade. Os outros três pacientes receberam terapia antifúngica associada a corticoide sistêmico, entretanto esse esquema é recomendado para casos de ABPA<sup>31,93</sup>, e somente a paciente 002 foi tratada com base nesse possível diagnóstico.

A aspergilose pulmonar na FC não se restringe apenas à ABPA e nossos achados sugerem que outras formas clínicas podem ser de importância e deverão ser investigadas para melhor identificação e tratamento dos casos.

## 6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Como limitações deste estudo, devemos destacar que a implantação do protocolo de investigação e tratamento de micobacterioses e ABPA nos serviços pediátrico e de pneumologia do HC Unicamp foi assimilada progressivamente pelos profissionais, resultando em algumas perdas de casos e condutas diferentes das recomendadas.

O retorno algumas vezes irregular e a negativa ou falha na coleta de amostras interferiu diretamente no desenvolvimento do trabalho, no que diz respeito a número de amostras colhidas e na análise dos dados.

A não utilização de recursos adicionais para aumentar a sensibilidade de isolamento das MNT pode, em parte, explicar o baixo número de casos detectados.

O *prick test*, disponível apenas no ambulatório da Pediatria, foi pouco utilizado, comprometendo a triagem de casos suspeitos de ABPA.

Pacientes exacerbados, em sua maioria, foram tratados em outros serviços ou em *home care*, perdendo-se o acompanhamento para investigação de ABPA.

## 7 CONCLUSÃO

A elaboração e implantação dos protocolos de busca sistemática da infecção por MNT e de ABPA permitiu pela primeira vez, embora com limitações, conhecer a prevalência e importância desses agentes na FC em nosso meio, bem como sistematizar seu diagnóstico e condutas.

### **Micobactérias**

A prevalência de MNT (6%) em nosso serviço se equipara aos níveis mais baixos relatados na literatura.

As espécies predominantemente isoladas foram *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium abscessus*.

Não foi identificado nenhum caso de *M. tuberculosis* entre os pacientes investigados.

A grande maioria dos casos encontrados apresentou infecção crônica por *P. aeruginosa* e *S. aureus*, VEF<sub>1</sub> em valores abaixo do predito e achados tomográficos de importante comprometimento pulmonar.

### **Fungos oportunistas e ABPA**

A prevalência encontrada de *Aspergillus sp.* foi de 53% e 29% para *Candida sp.*, compatíveis com os dados da literatura. Entretanto, neste período não foi possível caracterizar nenhum caso de ABPA entre os pacientes investigados.

As principais espécies isoladas foram *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*.

A coleta anual aleatória de uma amostra para dosagem de IgE sérica e os parâmetros recomendados para investigação de ABPA não permitiram identificar estes casos, exceto para comparação de exames colhidos durante períodos de piora clínica.

Outros quadros de aspergilose pulmonar como sensibilização e bronquite por *Aspergillus sp.* pareceram ser mais frequentes e merecem melhor investigação em nossa população.

## REFERÊNCIAS

1. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):299-323.
2. Bernardi DM, Ribeiro AF, Mazzola TN, Vilela MM, Sgarbieri VC. The impact of cystic fibrosis on the immunologic profile of pediatric patients. *J Pediatr (Rio J).* 2013;89(1):40-7.
3. Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremmer N, Sarles J, et al. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2008;3(8):eL08.
4. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med.* 2007;28(2):279-88.
5. Delhaes L, Monchy S, Fréal E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One.* 2012;7(4):e36313.
6. Kiska DL, Riddell SW. *Practical Laboratory Aspects of Cystic Fibrosis Microbiology: an Update, Part I* New York 2012.
7. Horr e R, Symoens F, Delhaes L, Bouchara JP. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. *Med Mycol.* 2010;48 Suppl 1:S1-3.
8. Verregghen M, Heijerman HG, Reijers M, van Ingen J, van der Ent CK. Risk factors for *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis patients; a case-control study. *J Cyst Fibros.* 2012;11(4):340-3.
9. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med.* 2012;6(6):597-612.
10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infec o Relacionada   Assistência   Saúde. M dulo7: Detec o e Identifica o de Micobactérias de Importância Médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2013. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/deteccao-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica>.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_laboratorial\\_tuberculose.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf).
12. Radhakrishnan DK, Yau Y, Corey M, Richardson S, Chedore P, Jamieson F, Dell SD. Non-tuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis: isolation, prevalence, and predictors. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(11):1100-6.
13. Leung JM, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2013;34(1):124-34.
14. Kiska DL, Riddell SW. *Practical Laboratory Aspects of Cystic Fibrosis Microbiology: an Update, Part II* Clinical Microbiology Newsletter 2012.
15. Oliver A, Alarc n T, Caballero E, Cant n R. [Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(2):89-104.
16. Binder AM, Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide

- use among persons with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(7):807-12.
17. Catherinot E, Roux AL, Vibet MA, Bellis G, Ravilly S, Lemonnier L, et al. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *J Cyst Fibros*. 2013;12(1):74-80.
  18. Foweraker J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull*. 2009;89:93-110.
  19. Leung JM, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria: the changing epidemiology and treatment challenges in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(6):662-9.
  20. Girón RM, Máiz L, Barrio I, Martínez MT, Salcedo A, Prados C. Nontuberculous mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: a multicenter prevalence study. *Arch Bronconeumol*. 2008;44(12):679-84.
  21. Jordan PW, Stanley T, Donnelly FM, Elborn JS, McClurg RB, Millar BC, et al. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Lett Appl Microbiol*. 2007;44(5):459-66.
  22. McEvoy S, Lavelle L, Kilcoyne A, McCarthy C, deJong PA, Loeve M, et al. High-resolution CT of nontuberculous *mycobacterium* infection in adult CF patients: diagnostic accuracy. *Eur Radiol*. 2012;22(12):2736-42.
  23. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367-416.
  24. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/deteccao-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica>.
  25. Bains SN, Judson MA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Chest Med*. 2012;33(2):265-81.
  26. de Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJ, Bonten MJ, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(9):1381-6.
  27. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Rittié JL, Tétu L, et al. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis*. 2012;44(11):842-7.
  28. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):560-6.e10.
  29. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol*. 2009;47(4):387-97.
  30. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):535-51.

31. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46(3):327-60.
32. Bouchara JP, Hsieh HY, Croquefer S, Barton R, Marchais V, Pihet M, et al. Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):142-52.
33. Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, Walker JM, Elborn JS, Rendall J, et al. Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros*. 2008;7(6):566-72.
34. Liu JC, Modha DE, Gaillard EA. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? *J Cyst Fibros*. 2013;12(3):187-93.
35. Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrère J, Degand N, Mely L, et al. *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(7):2381-6.
36. Chotirmall SH, McElvaney NG. Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:161-73.
37. Middleton PG, Chen SC, Meyer W. Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(6):670-5.
38. Chabi ML, Goracci A, Roche N, Paugam A, Lupo A, Revel MP. Pulmonary aspergillosis. *Diagn Interv Imaging*. 2015;96(5):435-42.
39. King J, Brunel SF, Warris A. Aspergillus infections in cystic fibrosis. *J Infect*. 2016;72 Suppl:S50-5.
40. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011;20(121):156-74.
41. Chrdele A, Mustakim S, Bright-Thomas RJ, Baxter CG, Felton T, Denning DW. Aspergillus bronchitis without significant immunocompromise. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1272(1):73-85.
42. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. Aspergillus bronchitis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006;130(1):222-6.
43. Moss RB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and Aspergillus infection in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16(6):598-603.
44. Knutsen AP, Slavov RG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma and cystic fibrosis. *Clin Dev Immunol*. 2011. Epub 2011 Apr 5.
45. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(8):850-73.
46. Thia LP, Balfour Lynn IM. Diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2009;10(1):37-42.
47. Delhaes L, Frealle E, Pinel C. Serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: State of the art and further challenges. *Med Mycol*. 2010;48 Suppl 1:S77-87.
48. Rapaka RR, Kolls JK. Pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: current understanding and future directions. *Med Mycol*. 2009;47 Suppl 1:S331-7.

49. Latzin P, Hartl D, Regamey N, Frey U, Schoeni MH, Casaulta C. Comparison of serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2008;31(1):36-42.
50. Moreira AS, Silva D, Ferreira AR, Delgado L. Antifungal treatment in allergic bronchopulmonary aspergillosis with and without cystic fibrosis: a systematic review. *Clin Exp Allergy*. 2014.
51. Barton RC, Hobson RP, Denton M, Peckham D, Brownlee K, Conway S, et al. Serologic diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis through the detection of immunoglobulin G to *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(3):287-91.
52. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003;37 Suppl 3:S225-64.
53. Jubin V, Ranque S, Stremmer Le Bel N, Sarles J, Dubus JC. Risk factors for *Aspergillus* colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45(8):764-71.
54. Yeboah-Manu D, Yates MD, Wilson SM. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):4166-8.
55. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):175-8.
56. Qvist T, Pressler T, Hoiby N, Katzenstein L. Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Resp Res* 2014;15:41.
57. Martiniano S. et al. Clinical significance of a first positive Nontuberculous Mycobacteria Culture in Cystic Fibrosis. *Annals ATS* 2014;11(1):36-44.
58. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ Jr, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, et al. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(6):828-34.
59. Esther CR Jr, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010;9(2):117-123.
60. Bar-On O, Mussafi H, Mei-Zahav M, Prais D, Steuer G, Stafler P et al. Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2015;14(1):53-62.
61. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax*. 2016;71(1):i1-i22.
62. Levy I, Grisarso-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, et al. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):378-84.
63. Renna M, Schaffner C, Brown K, Shang S, Tamayo MH, Hegyi K, et al. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3554-63.
64. Qvist T, Taylor-Robinson D, Waldmann E, Olesen HV, Hansen CR, Mathiesen IH, Høiby N, et al. Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015;S1569-1993(15):00215-5.

65. Chmiel JF, Aksamit TR, Chotirmall SH, Dasenbrook EC, Elborn JS, LiPuma JJ, *et al.* Antibiotic Management of Lung Infections in Cystic Fibrosis. II. Nontuberculous Mycobacteria, Anaerobic Bacteria, and Fungi. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(8):1298-1306.
66. Adjemian J, Oliver KN, Seitz AE, Falkinham III JO, Holland SM, Prevots R. Spatial clusters of nontuberculous mycobacterial lung disease in the United States. *Am J Resp Crit Care Med* 2012;186(6):553-8.
67. Adjemian J, Olivier KN, Prevots R. Nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in the United States: Screening Practices and Environmental Risk. *Am J Resp Crit Care Med* 2014;190(5):581-86.
68. Collaco JM, McGready J, Green DM, Naughton KM, Watson CP, Shields T, Bell SC, Wainwright CE, Cutting GR; ACFBAL Study Group. Effect of temperature on cystic fibrosis lung disease and infections: a replicated cohort study. *PLoS ONE* 2011;6:e27784.
69. Cândido PHC, Nunes LS, Marques EA, Folescu TW, Coelho FS, Moura VCN, Silva MG, Gomes KM, Lourenço MCS, Aguiar FS, Chitolina F, Armstrong DT, Leão SC, Neves FPG, Mello FCQ, Duarte RS. Multidrug-Resistant Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; Volume 58, Number 8, p. 2990 –2997.
70. Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, *et al.* III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J. bras. pneumol.* 2009;35(10):1018-48.
71. Rosemberg J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. *Bol. Pneumol. Sanit.* 2001; 9(1):35-59.
72. Barreto ML, Pereira SM, Ferreira AA. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. *J. Pediatr.* 2006;82(3): s45-s54.
73. Romanus V, Hallander HO, Wåhlén P, Olinder-Nielsen AM, Magnusson PH, Juhlin I. Atypical mycobacteria in extrapulmonary disease among children. Incidence in Sweden from 1969 to 1990, related to changing BCG-vaccination coverage. *Tuber Lung Dis.* 1995;76(4):300-10.
74. Yang XY, Chen Q, Li Y, Wu S. *Mycobacterium vaccae* as adjuvant therapy to anti-tuberculosis chemotherapy in never-treated tuberculosis patients: a meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(9):e23826.
75. Gomes LH, Otto TD, Vasconcellos EA, Ferrão PM, Maia RM, Moreira AS, *et al.* Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. *J Bacteriol.* 2011;193(19):5600-1.
76. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, *et al.* Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol.* 2010;48(sup1):S88-97.
77. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV1 decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest.* 2010;138(5):1186-95.
78. Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller FM. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2010 ;48(1):56-63.
79. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med.* 2014;34(2):197-217.



80. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2014;52(2):179-86.7
81. Chotirmall SH, Branagan P, Gunaratnam C, McElvaney NG. *Aspergillus*/allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Irish cystic fibrosis population: a diagnostically challenging entity. *Respir Care.* 2008;53(8):1035-41.
82. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, et al. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2243-51.
83. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Tétu L, Segonds C, et al. *Aspergillus* sensitization or carriage in cystic fibrosis patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(7):680-6.
84. Noni M, Katelari A, Dimopoulos G, Kourlaba G, Spoulou V, Alexandrou-Athanassoulis H, et al. Inhaled corticosteroids and *Aspergillus fumigatus* isolation in cystic fibrosis. *Med Mycol.* 2014;52(7):715-22.
85. Sharma VK, Raj D, Xess I, Lodha R, Kabra SK. Prevalence and risk factors for allergic bronchopulmonary aspergillosis in Indian children with cystic fibrosis. *Indian pediatrics.* 2014;51(4):295-7.
86. Almeida MB, Bussamra MH, Rodrigues JC. ABPA diagnosis in cystic fibrosis patients: the clinical utility of IgE specific to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens. *J. Pediatr.* 2006;82(3):215-20.
87. Carneiro ACC, Lemos ACM, Arruda SM, Santana MAPS. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis in the state of Bahia, Brazil. *J. bras. pneumol.* 2008; 34(11):900-906.
88. Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, et al. *Aspergillus*-associated airway disease, inflammation, and the innate immune response. *Biomed Res Int.* Epub 2013.
89. Gernez Y, Tirouvanziam R, Yu G, Ghosn EE, Reshamwala N, Nguyen T, et al. Basophil CD203c levels are increased at baseline and can be used to monitor omalizumab treatment in subjects with nut allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;154(4):318-27.
90. Fricker-Hidalgo H, Coltey B, Llerena C et al. Recombinant allergens combined with biological markers in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17:1330–6.
91. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest.* 2006;130(1):222-6.
92. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(12):1765-78.
93. Patterson KC, Strek ME. Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest.* 2014;146(5):1358-68.

## APÊNDICE

**Apêndice 1:** Protocolo de investigação laboratorial, acompanhamento e critérios para tratamento de pacientes com infecções oportunistas por micobactérias e ABPA na FC..

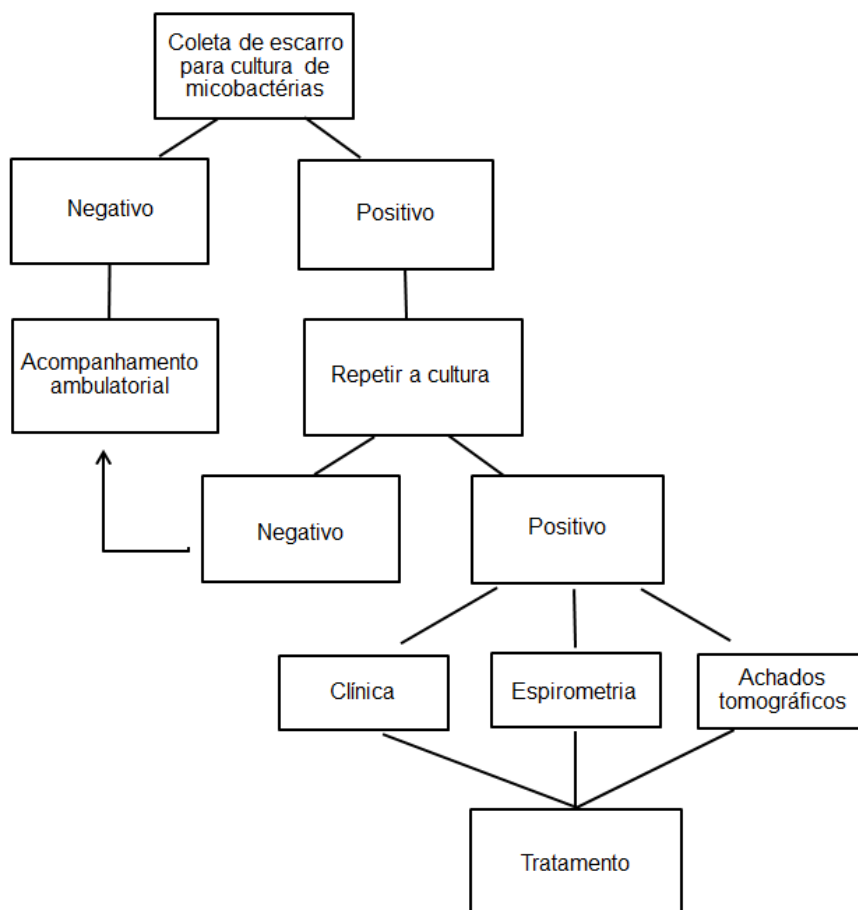
### PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL, ACOMPANHAMENTO E CRITÉRIOS PARA TRATAMENTO DE PACIENTES COM INFECÇÕES OPORTUNISTAS POR MICOBACTÉRIAS E ASPERGILOSE BRONCOPULMONAR ALÉRGICA (ABPA)

#### INFECÇÕES OPORTUNISTAS POR MICOBACTÉRIAS<sup>1</sup>

A investigação de micobactérias deverá ser iniciada por meio da coleta de escarro para cultura de micobactérias:

- anualmente, para todo paciente com  $\geq 6$  anos;
- em pacientes em exacerbação e/ou piora clínica que não respondam a antimicrobianos;
- em pacientes que apresentem imagem em raio-X ou TC sugestivas de infecção oportunista

Para prosseguir a investigação, seguir orientações do fluxograma.



Para diagnóstico de doença por MNT, serão necessárias, ao menos, duas culturas positivas para o mesmo agente, além de critérios clínicos, espirométricos e tomográficos.

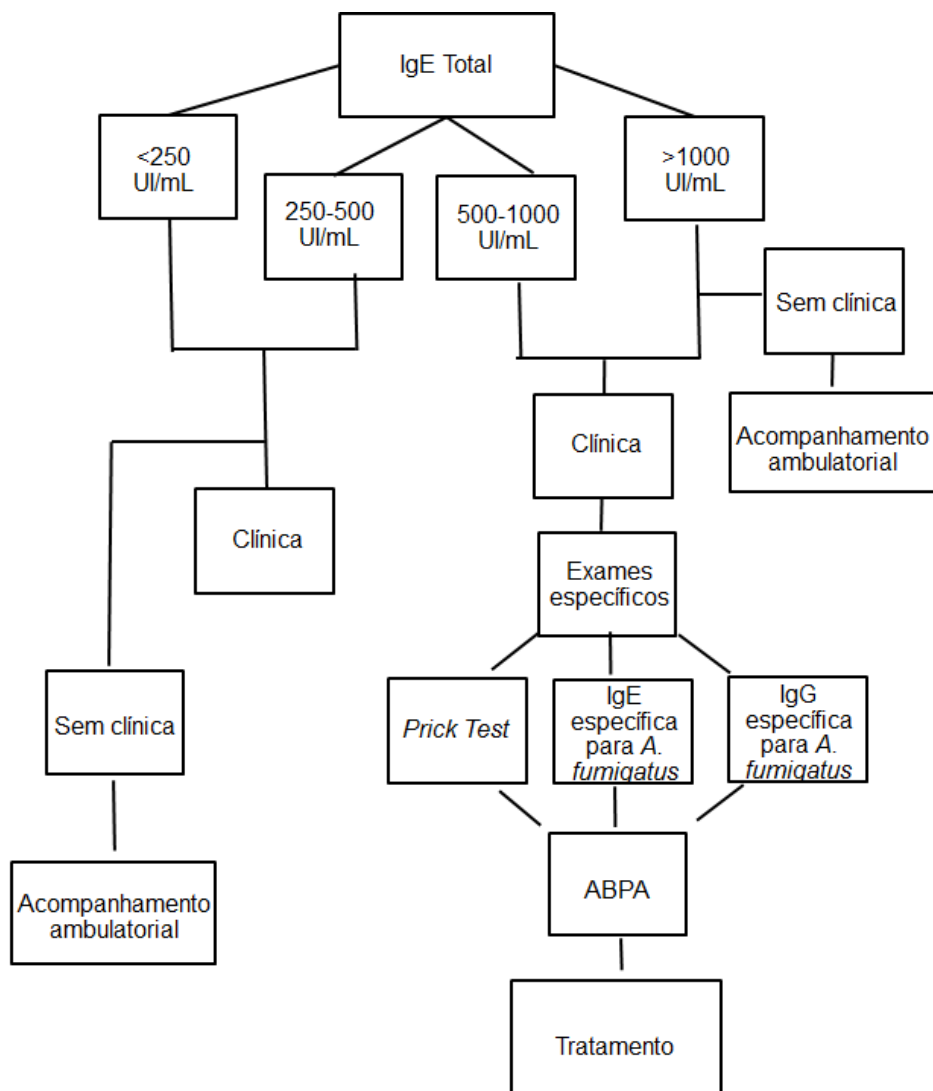
A decisão de tratar deve considerar os riscos e benefícios do tratamento.

### ASPERGILOSE BRONCOPULMONAR ALÉRGICA (ABPA)

A investigação de ABPA deverá ser iniciada por meio da dosagem de IgE total no soro:

- anualmente, para todo paciente com  $\geq 6$  anos;
- em pacientes em exacerbação relacionada à presença do *Aspergillus* sp. no escarro
- em pacientes em exacerbação que não respondam a antimicrobianos

Para prosseguir a investigação, seguir orientações do fluxograma.



Para diagnóstico de ABPA, os critérios estabelecidos por Stevens et al.<sup>2</sup> deverão ser preenchidos, conforme listados abaixo:

*Critérios clássicos:*

- a. Deterioração clínica aguda ou subaguda (tosse, chiado, intolerância ao exercício, asma induzida pelo exercício, declínio na função pulmonar, aumento da produção de escarro) não atribuídas à outra etiologia.
- b. IgE sérica > 1000 UI/ml, exceto se o paciente estiver fazendo uso de corticosteróide sistêmico (neste caso, repetir o teste após a descontinuação do tratamento).
- c. Teste de reatividade cutânea imediata positivo para *Aspergillus sp.* (presença de uma pápula endurecida > 3 mm, circundada por halo de eritema, quando o paciente não estiver sendo tratado com anti-histamínicos sistêmicos) ou presença de IgE específica para *A. fumigatus*.
- d. Precipitinas contra antígeno *A. fumigatus* ou IgG específica para *A. fumigatus*.
- e. Novas ou recentes anormalidades em imagens radiológicas (infiltrados ou impactação mucóide) ou em tomografia computadorizada (TC) de tórax (bronquiectasias) sem resposta ao uso de antibióticos e/ou fisioterapia.

*Critérios mínimos:*

- a. Deterioração clínica aguda ou subaguda (tosse, chiado, intolerância ao exercício, asma induzida pelo exercício, declínio na função pulmonar, aumento da produção de escarro) não atribuídas à outra etiologia.
- b. IgE sérica > 500 UI/ml, exceto se o paciente estiver fazendo uso de corticosteróide sistêmico (neste caso, repetir o teste após a descontinuação do tratamento). Se houver suspeita de ABPA e o nível de IgE total for entre 200-500 UI/ml, a repetição do teste em 1-3 meses é recomendada.
- c. Teste de reatividade cutânea imediata positivo para *Aspergillus sp.* (presença de uma pápula endurecida > 3 mm, circundada por halo de eritema, quando o paciente não estiver sendo tratado com anti-histamínicos sistêmicos) ou presença de IgE específica para *A. fumigatus*.
- d. Um dos seguintes: (A) precipitinas contra antígeno *A. fumigatus* ou IgG específica para *A. fumigatus*; ou (B) novas ou recentes anormalidades em imagens radiológicas (infiltrados ou impactação mucóide) ou em TC de tórax (bronquiectasias) sem resposta ao uso de antibióticos e/ou fisioterapia.

Sugestões para triagem de ABPA em pacientes com FC:

- 1) manter alto nível de suspeita de ABPA em pacientes com mais de seis anos de idade;
- 2) determinar a concentração de IgE total no soro anualmente. Se a concentração for > 500 UI/ml, determinar reatividade cutânea imediata ao *A. fumigatus* ou usar um ensaio *in vitro* para dosar IgE específica para *A. fumigatus*. Se os resultados forem positivos, considerar o diagnóstico com base nos critérios mínimos;
- 3) Se a concentração de IgE total no soro for entre 200-500 UI/ml, repetir a dosagem se houver um aumento na suspeita de ABPA, tal como por uma exacerbação da doença e realizar mais

estes de diagnóstico (teste cutâneo imediato para *A. fumigatus*, teste *in vitro* de IgE específica para o *A. fumigatus*, precipitinas contra *A. fumigatus* ou IgG específica para *A. fumigatus* e radiografia do tórax)<sup>2</sup>.

O tratamento de ABPA deve ser realizado com corticosteroide sistêmico associado a antifúngico.

Referências:

1. Griffith DE, Aksmit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367-416.
2. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003;37 Suppl 3:S225-64.

**Apêndice 2:** Descrição clínica dos sete casos com isolamentos de MNT analisados no período de estudo.

**Caso I:** paciente feminina, 58 anos, cuja cultura foi positiva para *M. intracellulare*. Em nosso serviço, essa foi a única amostra de escarro positiva da paciente. No entanto, a mesma era anteriormente seguida em outro serviço, onde outras quatro culturas de escarro foram positivas para micobactérias (sem identificação de espécie). A espirometria mostra distúrbio funcional grave, provavelmente misto (obstrutivo e restritivo). Na TC de tórax, pode-se observar a presença de bronquiectasias cilíndricas em lobo médio e língula, além de micronódulo incharacterístico, opacidade em vidro fosco e micronódulos centrolobulares esparsos. Clinicamente, a paciente apresenta quadros de hemoptise recorrentes, mas até o momento não houve indicação de tratamento específico e segue em acompanhamento ambulatorial.

**Caso II:** paciente masculino, 16 anos, apresentou uma única amostra positiva para MNT no período de estudo. Bem nutrido, sem alteração na espirometria, e em TC de tórax observam-se bronquiectasias cilíndricas em lobos superiores e inferiores, bilateralmente, com área de impactação de muco, além de pequenos nódulos centrolobulares esparsos, configurando sinal de árvore em brotamento. Na expiração, áreas de aprisionamento aéreo evidentes em lobos superiores, bilateralmente, e segmentos superiores de lobos inferiores. As culturas de amostras respiratórias colhidas posteriormente foram negativas para MNT. O paciente não foi tratado e continua em seguimento ambulatorial.

**Caso III:** paciente feminina, 38 anos, apresentou duas culturas positivas para *M. avium* no período de estudo, além de uma amostra positiva para o mesmo agente em 2013. Bem nutrida e a espirometria evidencia distúrbio ventilatório obstrutivo grave com CVF reduzida. Na TC podem ser visualizadas bronquiectasias cilíndricas e císticas difusas, com bronquiolectasias e impactação de muco nos lobos inferiores. Culturas recentes permanecem negativas. Não foi indicado tratamento e mantém seguimento ambulatorial.

**Caso IV:** paciente feminina, 13 anos, desnutrida, apresentando exacerbações mais frequentes nos dois últimos anos quando comparados aos cinco anos anteriores ao estudo. A TC de tórax revelou bronquiectasias císticas e cilíndricas, bilateralmente, áreas de vidro fosco nos lobos superiores e inferiores, além de nódulos centrolobulares que configuram sinal de árvore em brotamento em lobos inferiores. Diante de duas culturas positivas para *M. abscessus* e considerando sinais clínicos, alteração espirométrica grave (distúrbio ventilatório obstrutivo grave com CVF reduzida, possivelmente um distúrbio misto), e piora no padrão tomográfico, optou-se por iniciar o tratamento com claritromicina e amicacina inalatória em junho/2015. As culturas realizadas após o início do tratamento permanecem negativas.

**Caso V:** paciente masculino, nove anos, com desnutrição importante, apresentando histórico de exacerbações recorrentes desde 2009. Duas amostras de escarro foram positivas para MNT, no entanto, a identificação de espécie foi realizada apenas em uma das amostras, mas possivelmente se tratava do mesmo agente. Dependente de oxigenoterapia, apresentava distúrbio funcional grave, provavelmente misto (obstrutivo e restritivo) à espirometria. À TC de tórax pode ser notada a presença de bronquiectasias císticas e cilíndricas nos lobos superiores, espessamento peribrônquico moderado, impactação de muco em grandes proporções no lobo superior direito, mas presente em todos os lobos, além de nódulos centrolobulares com árvore em brotamento difuso, principalmente em lobos inferiores. Evoluiu a óbito em outubro/2015 em decorrência da doença de base.

**Caso VI:** paciente masculino, 21 anos, clinicamente bem, com distúrbio ventilatório obstrutivo moderado à espirometria. Apresentou cinco amostras positivas para *M. avium*, além de uma amostra positiva para o mesmo agente em 2013. A TC de tórax mostrava bronquiectasias e espessamento peribrônquico esparsos, atelectasia em língula, pequenos nódulos em lobos superiores e nódulo calcificado (4mm) em lobo médio. Apesar do bom estado geral, considerando a evolução nas alterações tomográficas, funcionais e a repetição do achado microbiológico, optou-se por iniciar tratamento com etambutol, rifampicina e claritromicina, em julho/2015. As culturas realizadas posteriormente foram negativas.

**Caso VII:** paciente masculino, 22 anos, apresentou uma única amostra positiva para MNT, tendo sido optado por apenas monitorá-lo após o primeiro isolamento. Tem TC de tórax com bronquiectasias cilíndricas, bilateralmente, em lobos superiores, em segmentos apicais dos lobos inferiores, lobo médio e língula, pequenos nódulos centrolobulares, configurando árvore em brotamento em lobo médio e língula, além de nódulos centrolobulares em segmentos basais dos lobos inferiores, com aspecto de impactação mucoide. Em expiração, apresenta leve aprisionamento aéreo nos lobos superiores. Apesar das alterações tomográficas e distúrbio ventilatório obstrutivo moderado à espirometria, o paciente apresenta-se clinicamente bem, sem tratamento e em acompanhamento ambulatorial.

**Apêndice 3:** Espécies de fungos oportunistas isoladas em 80 pacientes com FC, com pelo menos uma cultura de material respiratório positiva durante o período de março de 2014 a dezembro de 2015.

Pacientes	Microrganismo Isolado												
	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Paecilomyces sp.</i>
001												X	
002							X	X	X				
003								X					
004		X								X			
005		X				X	X						
006							X						
007		X											
008		X	X				X						
009		X											
100								X					
011		X											
012							X	X					
013		X					X	X					
014		X											
015		X				X	X	X					
016					X			X					



Pacientes	Microorganismo Isolado												
	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Paecilomyces</i> sp.
017		X											
018								X				X	
019							X	X					
020		X					X	X	X		X		
021							X	X					
022		X											
023							X					X	
024							X	X					
025		X											
026		X											
027							X	X					
028		X					X	X			X		
029								X					
030								X					
031							X	X					
032			X					X					
033							X	X					
034										X		X	





Pacientes	Microorganismo Isolado												
	Candida sp.	C. albicans	C. tropicalis	C. krusei	C. parapsilosis	C. dubliniensis	Aspergillus sp.	A. fumigatus	A. flavus	A. niger	A. terreus	Penicillium sp.	Paecilomyces sp.
072								X					
073								X					
074								X				X	
075								X	X				X
076							X	X					
077							X	X					
078		X					X	X	X		X		
079	X	X					X	X					
080							X	X					