

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

CLÁUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES

**PREVALÊNCIA DE ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA EM PACIENTES
COM TUBERCULOSE**

**CAMPO GRANDE
2021**

CLÁUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES

**PREVALÊNCIA DE ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA EM PACIENTES
COM TUBERCULOSE**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof. Dra Anamaria Mello Miranda Paniago.

**CAMPO GRANDE
2021**

FOLHA DE APROVAÇÃO



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Tese Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias Doutorado

Aos vinte e quatro dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e um, às treze horas e trinta minutos, na modalidade de videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Anamaria Mello Miranda Paniago (UFMS), Antonio José Grande (UEMS), Marcello Mihailenko Chaves Magri (USP), Paulo de Tarso Guerrero Muller (UFMS) e Rinaldo Poncio Mendes (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES, CPF 47502312153, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "PREVALÊNCIA DE ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE" e orientação de Anamaria Mello Miranda Paniago. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer exposto conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiação
Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago (Interno)		aprovada
Dr. Antonio José Grande (Interno)		aprovada
Dr. Marcello Mihailenko Chaves Magri (Externo)		aprovada
Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem (Interno) (Suplente)		
Dr. Paulo de Tarso Guerrero Müller (Externo)		aprovada
Dr. Rinaldo Poncio Mendes (Interno)		aprovada

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

AGRADECIMENTOS

Procurando as melhores palavras para expressar o que sinto no término de nosso estudo, encontrei que a gratidão é um estado de espírito e que pode não se referir somente a bons acontecimentos. Os acontecimentos de toda uma vida, boas experiências e também as ruins, nos trazem todo o aprendizado adquirido, o privilégio das novas amizades, o reconhecimento da fragilidade de cada um e o melhor, o reconhecimento de que há muitas pessoas interessadas no melhor que o outro tem a oferecer.

Penso nisso, na missão do ser humano nesta vida e por isso a gratidão é um sentimento que sempre vai me acompanhar. Gratidão primeiramente a Deus, por todo aprendizado que posso oferecer aos pacientes para minimizar a sua dor e melhorar sua qualidade de vida. Obrigada Deus por contar com a parceria de pessoas que o Senhor colocou em minha vida!!!! Por tudo que o Senhor deseja mostrar ao nosso redor, fazendo-nos refletir entre o certo e o errado. Obrigada por tudo que o Senhor tem feito em nossas vidas e na vida das pessoas da minha família, assim como na vida das pessoas que estudam e trabalham comigo e também me orientam.

Obrigada aos meus pais que com todas as dificuldades que a vida nos ofereceu nunca deixaram que me faltasse nada e assim como o estudo que me proporcionaram. Sempre me ensinaram o certo e o errado e sempre estiveram juntos torcendo por mim. Mãe obrigada por todo o carinho e cuidado que sempre teve por mim!!! A senhora me ensinou a entender que temos uma missão onde quer que a gente esteja!!!

Gratidão pelo amor e carinho do meu esposo, pois se você não estivesse nesses momentos para me trazer serenidade, seria muito difícil chegar até aqui! Você sabe que é meu melhor amigo!!! Amo muito você!!! Obrigada por tudo!!!

Minha filha Luísa e minha sobrinha Bruna sempre foram meus tesouros e meu estímulo para continuar sendo uma pessoa melhor. Hoje Deus me deu de presente mais um filho, o João Mateus!!!! Obrigada pela oportunidade de ser mãe, tia-mãe e agora, tia-avó, pois a existência de vocês em minha vida é o maior motivo para continuar crescendo como ser humano!!! Obrigada meus amores!!!

Gratidão por trabalhar com tantas pessoas diferentes, e muitas vezes tão parecidas. Muitos sentimentos intensos me trouxeram até este momento e só consigo pensar como as pessoas são importantes para o nosso crescimento.

De forma muito especial, minha eterna gratidão à Profa Anamaria, que esteve presente em minha vida desde a minha formação acadêmica. No internato na antiga

enfermaria da DIP, o seu carinho, a sua paciência, o seu conhecimento e o seu respeito aos profissionais me fizeram decidir pela especialidade. Fui então presenteada por duas vezes com sua orientação, mestrado e doutorado. Aprendo todos os dias com a sua orientação e realmente espero poder retribuir todo o conhecimento humano e científico que me proporcionou até hoje. Nesses quatro anos, o maior estímulo para chegar até este momento foi o compromisso que tenho com minha orientadora, retribuindo toda a sua paciência comigo. Obrigada profa. Ana!!!!

De forma também especial, quero agradecer a duas pessoas muito importantes para o meu aprendizado durante todo o doutorado, Sandra Leone e James Venturini. Sou muito privilegiada por conhecer pessoas como vocês. Agradeço pela paciência, pelo carinho, por sempre colaborarem com o seu conhecimento e experiência para o meu aprendizado. A revisão sistemática foi um presente da Sandra para mim. Obrigada Sandra por tudo!!! James, obrigada por ser meu parceiro dentro da revisão sistemática, você foi muito importante para o meu discernimento durante a realização do trabalho e sou eternamente grata!!!!

Tenho gratidão profunda pela equipe do SCIH/CCIH e do Núcleo de Vigilância do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, que me acompanham há 18 anos. Cresci como profissional nessa instituição e agradeço por cada pessoa que conheci e aprendi a respeitar durante todos esses anos. De forma especial, agradeço à minha amiga Mara Galiz, parceira desde a época da enfermaria da DIP, ajudando-me nas coberturas dos créditos do mestrado e também do doutorado. Parceira de estudo e mais do que isso, uma amiga conselheira para os momentos bons e ruins. Obrigada por tudo!!!

Também agradeço muito pela parceria da Enfa. Suse Castilho, que realizou a maior parte das coletas de dados e amostras clínicas dos pacientes internados no HRMS. A sua alegria em participar deste projeto sempre foi estímulo para mim. Sinto saudades de sua parceria. Obrigada Suse!!!

Também agradeço a Enfa. Simone que substituiu a Enfa. Suse no final do projeto e sua ajuda foi importante para a nossa finalização. Muito obrigada Simone!!!

Muita gratidão pelo Laboratório de Microbiologia do HRMS, em especial Caroline Tieppo e Bruna Abdul, por colaborarem com o projeto e por lutarem por uma microbiologia de excelência em nossa instituição.

Muita gratidão pelo Laboratório de Micologia do HUMAP, em especial à Maína e Gláucia por serem minhas referências na identificação dos fungos e muito mais do que isso, auxiliando de maneira voluntária na identificação de outros agentes, com o objetivo de

ajudar no diagnóstico e tratamento de tantos doentes. Muito obrigada pela dedicação de vocês!!!

Agradeço muito a Edy por toda a colaboração no armazenamento de nossas amostras na fase inicial de nosso trabalho, assim como o técnico Rafael do laboratório HUMAP.

Agradeço à equipe do ambulatório de tuberculose, à Profa Ana Paula, os PIBICs Maria, Rafael, Igor, Gabriela, Bruna por colaborarem com a construção do estudo e principalmente no cuidado que tiveram com os pacientes durante os atendimentos. Agradeço muito à Enfa. Wanessa que nos acompanhou com dedicação nos atendimentos.

Minha gratidão ao Hospital-Dia Esterina Corsini, à equipe médica e de enfermagem, às recepcionistas, ao Núcleo de Vigilância do HUMAP e ao Serviço de Controle de Infecção do HUMAP que fazem parte da minha vida profissional e que também colaboraram com a finalização deste trabalho. Tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo. Agradeço muito aos técnicos Josival, Vilela, Luis, Ivair por toda disponibilidade e ajuda na coleta e encaminhamentos dos pacientes para a realização dos exames de imagem. Agradeço também às Enfermeiras Evelyn e Corinny, além de Tânia do Núcleo de Vigilância do HUMAP por terem colaborado de todas as formas com os dados para o nosso ambulatório.

Agradeço muito ao técnico de enfermagem que com carinho chamamos de Marquinhos, pois além de me ajudar durante as coletas e encaminhamentos dos pacientes, colaborou de forma importante com essa tese, com seus conhecimentos sobre tecnologia de informação.

Muito obrigada à Enfa. Vânia e Enfa. Lívia por todo o apoio dentro do nosso serviço e de forma especial, muito obrigada à minha parceira de doutorado Enfa. Adriana, por aprendizado e toda a luta que passamos nesses quatro anos, para a finalização de nosso projeto. Agradeço também à nossa parceira de estudo Jennifer, sempre tão doce e comprometida. Obrigada Jennifer!!!

Obrigada a todas as pessoas da Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias e à equipe do LabDip, por sempre estarem atentos às nossas dificuldades e realização de nossas sorologias para a conclusão do estudo.

Obrigada à Dra. Eunice, pela sua colaboração e realização das culturas para BAAR pelo LACEN. Obrigada à chefia do Hemosul e principalmente às Sras. Marli e Marina que colaboraram de forma direta em nosso estudo.

Agradeço ao Prof Tietê, idealizador do nosso projeto, que trouxe qualidade de ensino, experiência e disciplina, colaborando com o nosso aprendizado.

Agradeço muito ao Prof. Antonio Grande, que trouxe muita segurança durante as minhas maiores dúvidas metodológicas na descrição da revisão sistemática, orientando de maneira irrestrita até a finalização do estudo. Muito obrigada, Dr. Antônio.

Muito obrigada ao Dr Thiago Nunes, residente Tiago e residente Reinaldo que participaram do atendimento de nossos pacientes, com a radiointervenção, além de colaborarem com a descrição das imagens para o estudo.

Muito obrigada à Dra. Sílvia Uehara pela parceria no hospital dia e pelas inúmeras dicas acadêmicas durante nossos plantões, além do grande auxílio na finalização da tese. Sempre me incentivando dentro das pesquisas. Aprendo muito com você Silvinha!!!

Muito obrigada ao Técnico de Radiologia Gustavo do HRMS/HUMAP por ter colaborado de forma tão dedicada com a aquisição das imagens.

Obrigada pela oportunidade de atender todos os pacientes neste estudo, que voluntariamente autorizaram a utilização de seus dados e coleta de amostras e que nosso grupo possa ter retribuído e continue contribuindo com qualidade e carinho para o seu atendimento.

Obrigada às instituições HUMAP e HRMS por autorizarem a realização deste trabalho e espero não ter esquecido de ninguém. Agradeço a todos que de forma direta ou indireta colaboraram com nosso estudo.

Obrigada à UFMS por tudo que me foi oferecido desde a minha graduação. Agradeço pela oportunidade de fazer parte do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias e por todo o apoio oferecido pela CAPES e FUNDECT.

Também preciso agradecer por Deus nos preservar e incluo todos os profissionais de saúde, durante toda essa pandemia e por ter permitido que pudéssemos vivenciar tantas experiências de amor e solidariedade. Mesmo com todas as dificuldades e luta que tivemos que enfrentar com essa nova doença tão avassaladora, que mudou totalmente nossas vidas, estamos finalizando nossos compromissos com a pesquisa. Que Deus abençoe os que se foram e traga força para persistir na luta aos que permanecem.

Muito obrigada!!!!

“Vou instruir-te e indicar-te o caminho a seguir, e aconselhar-te, pousando meus olhos sobre ti.”

S1 32,8

RESUMO

Aspergilose pulmonar crônica (APC) é uma doença fúngica negligenciada, com alta morbidade e mortalidade e as alterações anatômicas induzidas pela tuberculose pulmonar (TBP) são o principal fator predisponente. O seu diagnóstico é um desafio e a sua prevenção pouco conhecida e provavelmente, subestimada pela ausência de métodos diagnósticos mais acurados. Além dos exames microbiológicos, testes sorológicos como imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) ou contraímunoeletroforese (CIE) são ainda utilizados na rotina diagnóstica de APC. Mais recentemente o ELISA vem sendo utilizado como teste alternativo. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de APC em pacientes com TBP em dois serviços de saúde, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul e a acurácia dos testes sorológicos para o seu diagnóstico. Foram realizados dois estudos. O primeiro estudo foi uma revisão sistemática com objetivo de comparar a acurácia do teste ELISA com o teste de referência (IDD e/ou CIE) para o diagnóstico de APC. O estudo foi conduzido de acordo com “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses” (PRISMA). Nós realizamos a pesquisa nas bases eletrônicas MEDLINE (PubMed), EMBASE (Elsevier), LILACS (VHL), Cochrane library, and ISI Web of Science. Foram incluídos 14 artigos com casos de APC que foram submetidos aos dois testes: ELISA (teste índice) e IDD e/ou CIE (testes de referência) e que avaliaram a acurácia dos testes, mas somente quatro puderam ser metanalisados. Não encontramos diferença significativa em sensibilidade e especificidade nos 4 estudos metanalisados inicialmente, com uma moderada e alta heterogeneidade, respectivamente. Quando analisamos dois estudos com testes comerciais, as sensibilidades agrupadas foram de 0.95 (95% CI 0.93–0.97) e 0.49 (95% CI 0.45–0.54) respectivamente, para o teste ELISA e IDD/CIE, com nenhuma heterogeneidade. O segundo estudo foi transversal analítico com pacientes com TBP atendidos no ambulatório de Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) ou admitidos no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, entre fevereiro de 2016 a novembro de 2019. Para estimar a prevalência de APC nessa população, 193 pacientes consecutivos elegíveis foram incluídos no estudo. Foram submetidos à avaliação clínica, tomográfica, exames de escarro e sorologias pelo teste ELISA e IDD. A prevalência global de APC foi de 10,9%. Ter tido TBP há 4 anos ou mais e apresentar hemoptise foram mais frequentes em pacientes com APC, com *odds ratio* de 17.54 (1.85-166.67) e 9.61 (2.21-41.67), respectivamente. Cavitações, espessamento pleural e presença de bola fúngica foram as alterações tomográficas mais frequentes em APC. Considerando os casos de APC confirmados e 100 doadores de sangue saudáveis, não houve diferença significativa na avaliação de sensibilidade e especificidade, porém o teste de ELISA apresentou um desempenho melhor do que o teste IDD na avaliação do teste de Youden. A frequência de óbitos entre os pacientes com APC foi de 28,6%. Esses achados indicam a necessidade de vigilância contínua de APC em pacientes com TBP desde o tratamento e ao longo da vida, com avaliação clínica, tomográfica e sorológica, preferencialmente pelo método ELISA que demonstrou um melhor desempenho no diagnóstico de APC.

Palavras-chave: Aspergilose, aspergilose pulmonar crônica, tuberculose, teste imunoenzimático, teste de imunodifusão, contraímunoeletroforese, dados de acurácia, testes sorológicos.

ABSTRACT

Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) is a neglected fungal disease, with high morbidity and mortality and the anatomical changes induced by pulmonary tuberculosis (PTB) are the main predisposing factor. Its diagnosis is a challenge and its prevention is little known and probably underestimated by the absence of more accurate diagnostic methods. In addition to microbiological tests, serological tests such as double immunodiffusion on agar gel (DID) or counterimmunoelectrophoresis (CIE) are also used in the routine diagnosis of CPA. More recently, ELISA has been used as an alternative test. The aim of this study was to evaluate the prevalence of CPA in patients with PTB in two health services, in Campo Grande, Mato Grosso do Sul and the accuracy of serological tests for their diagnosis. Two studies were carried out. The first study was a systematic review with the objective of comparing the accuracy of the ELISA test with the reference test (DID and / or CIE) for the diagnosis of CPA. The study was conducted according to “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses” (PRISMA). We conducted the research in the electronic databases MEDLINE (PubMed), EMBASE (Elsevier), LILACS (VHL), Cochrane library, and ISI Web of Science. 14 articles were included with cases of CPA that were submitted to the two tests: ELISA (index test) and DID and / or CIE (reference tests) and that evaluated the accuracy of the tests, but only four could be meta-analyzed. We found no significant difference in sensitivity and specificity in the 4 studies initially analyzed, with a moderate and high heterogeneity, respectively. When we analyzed two studies with commercial tests, the grouped sensitivities were 0.95 (95% CI 0.93–0.97) and 0.49 (95% CI 0.45–0.54) respectively, for the ELISA and DID / CIE test, with no heterogeneity. The second cross-sectional study was conducted with patients with PTB treated at the outpatient clinic of Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) or admitted to the Regional Hospital of Mato Grosso do Sul (HRMS) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, between February 2016 and November 2019. To estimate the prevalence of CPA in this population, 193 consecutive eligible patients were included in the study. They underwent clinical, tomographic, sputum and serology tests using the ELISA and DID tests. The overall prevalence of CPA was 10.9%. Having had PTB 4 years or more and having hemoptysis were more frequent in patients with CPA, with odds ratios of 17.54 (1.85-166.67) and 9.61 (2.21-41.67), respectively. Cavitations, pleural thickening and the presence of a fungal ball were the most frequent tomographic changes in CPA. Considering confirmed cases of CPA and 100 healthy blood donors, there was no significant difference in the evaluation of sensitivity and specificity however, the ELISA test performed better than the DID test in the evaluation of the Youden test. The frequency of deaths among patients with CPA was 28.6%. These findings indicate the need for continuous surveillance of CPA in patients with PTB since treatment and throughout life, with clinical, tomographic and serological evaluation, preferably by the ELISA method that demonstrated a better performance in the diagnosis of CPA.

Keywords: Aspergillosis, chronic pulmonary aspergillosis, tuberculosis, enzyme immunoassay, immunodiffusion, agar gel electrophoresis, data accuracy, serological tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
APC	Aspergilose pulmonar crônica
APCC	Aspergilose pulmonar cavitária crônica
APFC	Aspergilose pulmonar fibrosante crônica
AI	Aspergilose invasiva
APSI	Aspergilose invasiva subaguda
BK	Bacilo de <i>Koch</i>
CIE	Contraimunoeletroforese
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA	Teste imunoenzimático
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida humana
IDD	Imunodifusão dupla em gel de ágar
IDSA	Infectious Disease Society of America
LBA	Lavado broncoalveolar
MS	Mato Grosso do Sul
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NTB	Micobactéria não tuberculosa
OMS	Organização Mundial da Saúde
SR	Sintomático respiratório
TB	Tuberculose
TC	Tomografia computadorizada
TBP	Tuberculose pulmonar
TBEP	Tuberculose extrapulmonar
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Aspergilose.....	14
2.2	Aspergilose pulmonar crônica.....	15
2.2.1	Etiopatogenia.....	16
2.2.2	Epidemiologia e fatores de risco.....	18
2.2.3	Manifestações clínicas.....	19
2.2.4	Diagnóstico.....	21
2.2.5	Tratamento.....	27
3	OBJETIVOS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	Artigo 1.....	33
5.2	Artigo 2 (Manuscrito).....	65
6	CONCLUSÃO.....	97
7	RECOMENDAÇÕES.....	98
	REFERÊNCIAS.....	99
	ANEXO	113

1 INTRODUÇÃO

Aspergilose pulmonar crônica (APC) é uma das diferentes formas clínicas da aspergilose e tem sido considerada uma doença fúngica negligenciada de grave evolução. É uma doença pulmonar lenta e progressiva causada pelo *Aspergillus* spp, que acomete pacientes com moderada, leve ou nenhuma imunossupressão. A doença geralmente se desenvolve em uma cavidade pulmonar preexistente decorrente de doença respiratória crônica, sendo a tuberculose (TB) a mais frequente.

A TB afeta cerca de 10 milhões de pessoas a cada ano e a prevalência de APC em pacientes com tuberculose tratada e a contribuição do seu diagnóstico errôneo para estimativas de prevalência de tuberculose ainda não são claras.

Cavitação residual após tratamento de TB pulmonar (TBP) pode ser identificada em 20 a 30% dos pacientes curados de tuberculose pulmonar. Esses dados são preocupantes e quando se aplicam taxas anuais de novos casos de APC, a estimativa é de que 112.000 a 160.000 pessoas poderão desenvolver a doença a cada ano após o término da terapia para TBP em todo o mundo.

A prevalência global de APC estimada é de 1,2 milhões de casos e apresenta um prognóstico reservado, com uma mortalidade de 38 a 85% em 5 anos.

O diagnóstico de APC é baseado em: a) achados sugestivos em exames de imagem, preferencialmente tomografia computadorizada (TC) de tórax; b) evidência microbiológica de infecção por *Aspergillus*; e, ou c) presença de resposta imune ao agente, mantidos por pelo menos 3 meses.

Testes sorológicos são indispensáveis para o diagnóstico na ausência de culturas positivas e são considerados os melhores testes não invasivos para o diagnóstico de APC. Inicialmente anticorpos contra *Aspergillus* spp foram detectados por reações de precipitação em ágar, com as provas de imunodifusão dupla (IDD) ou contraímuno eletroforese (CIE).

Na prática, reações de precipitação têm sido substituídas por *enzyme-linked immunoassay* (ELISA), na detecção de anticorpos específicos contra *Aspergillus* spp. Este tem sido considerado o teste mais rápido e sensível, produzindo resultados quantitativos necessitando menores volumes de soro de pacientes e extratos menores de *Aspergillus* por teste, sendo facilmente automatizado.

Considerando a APC como uma doença negligenciada, com poucos estudos bem desenhados sobre a sua prevalência no Brasil e no mundo, além da ampla variedade de métodos para detecção de anticorpos para *Aspergillus* e a falta de evidências de acurácia

diagnóstica para o teste ELISA, dois estudos foram desenvolvidos. O primeiro, uma revisão sistemática, comparando a acurácia de testes de precipitação com a de teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico sorológico da APC. O segundo estudo foi conduzido para estimar a prevalência de APC em pacientes em tratamento ou previamente tratados para TBP, bem como para avaliar a acurácia de testes sorológicos ELISA Platelia® e teste de precipitação por imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) para o seu diagnóstico, em um ambulatório para tratamento de TB e em um hospital de referência para pacientes críticos em Mato Grosso do Sul, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspergilose

A aspergilose é uma doença causada por espécies de *Aspergillus*, com um grande espectro de apresentações clínicas (VAN DE VEERDONK et al, 2017; KOSMIDIS; DENNING, 2015). É uma doença dependente do estado imunológico de base do hospedeiro que se apresenta dentro de três grupos: a) aspergilose invasiva (AI), no indivíduo imunossuprimido; b) aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), no indivíduo atópico e c) aspergilose pulmonar crônica (APC), no indivíduo imunocompetente ou com alguma imunossupressão (LATGÉ et al, 2019).

A AI é uma das causas mais comuns de óbito por doença infecciosa em pacientes com neutropenia grave, e letalidade entre 40 a 50% em receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas e leucemia aguda. Sua patogênese é baseada na invasão de hifas de *Aspergillus* nas arteríolas pulmonares e parênquima pulmonar, após a germinação de conídeos no pulmão, levando a uma necrose isquêmica. Além disso, após a invasão podem ocorrer disseminação hematogênica com trombose, infarto hemorrágico e invasão de outros órgãos (LATGÉ et al, 2019).

Em pacientes atópicos, a ABPA é a forma mais grave de aspergilose, ocorrendo após a sensibilização de alérgenos de *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), principalmente em pacientes com fibrose cística (PRICE et al, 2015) ou indivíduos com predisposição genética para ABPA (LATGÉ et al, 2019).

A principal forma de aspergilose em pacientes imunocompetentes, é a APC, que será tema de discussão nesta revisão, que pode variar desde uma simples bola fúngica (aspergiloma) a processos de cavitações, fibrose e inflamação crônica pulmonar (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al, 2018; DENNING et al, 2016).

A estimativa global de APC é de alta prevalência, diante de sua principal doença de base predisponente, a tuberculose pulmonar. Além disso, apresenta-se como uma doença de difícil definição diagnóstica, com alta mortalidade, dependendo de sua apresentação clínica (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2011). A APC está representada por várias entidades clínicas que serão objeto de nosso estudo e atualmente, tem sido definida como uma importante infecção fúngica negligenciada, diante de seu principal fator de risco, podendo também ser seu diagnóstico diferencial, a tuberculose pulmonar (BARAC et al., 2019; PAGE et al, 2019).

2.2 Aspergilose Pulmonar Crônica

Aspergilose pulmonar crônica (APC) é uma doença pulmonar lenta e progressiva causada pelo *Aspergillus* spp, que se desenvolve em uma cavidade preexistente de pacientes com doença respiratória crônica, sendo a TB seu principal fator predisponente. Apresenta uma prevalência global estimada de 1,2 milhões de casos (PAGE et al, 2019) e um prognóstico reservado, com uma alta taxa de mortalidade em 5 anos (PAGE et al, 2019; TAKANOZO et al, 2018).

A APC é uma infecção fúngica grave negligenciada (BROWN et al, 2012; BARAC et al, 2019) que frequentemente acomete pacientes com algum grau de imunossupressão ou que sejam imunocompetentes mas que apresentem uma doença pulmonar preexistente (BARAC et al, 2019).

Os principais fatores de risco para APC são alterações estruturais pulmonares causadas por outra doença, como cavidades no pulmão causados por TB, sarcoidose, pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, carcinoma broncogênico cavitário, abscesso pulmonar e infecções por micobactéria não tuberculosa (NTB). Bolhas ou cistos, bronquiectasias, infarto pulmonar e fibrose também são alterações que predispõem a instalação da APC. Em muitos países, TB pulmonar é a principal desordem que precede APC. Outras condições predisponentes menos comuns incluem ABPA, DPOC, tratamento de câncer de pulmão, asma, pneumonia e sarcoidose fibrocavitária (KANJ, ABDALLAH, SOUBANI, 2018; DENNING et al, 2018).

Pacientes em uso de corticosteroide, alcoolistas, com diabetes mellitus e em tratamento imunossupressor, também podem apresentar um quadro menor de imunossupressão e apresentarem APC. Como a APC geralmente surge em cavidades pré-formadas, também pode complicar outras condições que causam lesão pulmonar, como criptococose e radioterapia, respectivamente. De acordo com as condições predisponentes, a maioria dos casos da APC ocorrem em pacientes de meia idade, mas jovens com fibrose cística e adultos mais jovens, com história da tuberculose também podem ser afetados (SCHWEER et al, 2013).

2.2.1 Etiopatogenia

Aspergillus é um fungo filamentosso ubíquo, saprobiótico, isolado do solo, matéria orgânica em decomposição, poeira de construção e hospitais (KOUSHA et al, 2011; HANSEN et al, 2008). O gênero *Aspergillus* engloba mais de 340 espécies de fungos filamentosos (BENNETT et al, 2010); entretanto somente poucas são conhecidas como patogênicas aos humanos, incluindo *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*. *Aspergillus* spp. são uma exceção como agente patogênico (OHBA et al, 2012; SCHWEER et al, 2014).

O gênero *Aspergillus* pertence à família *Aspergillaceae* e apresenta-se geneticamente próximo ao gênero *Penicillium* (RAPER; FENNELL, 1965). Atualmente, o gênero *Aspergillus* é classificado em quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*) e 20 seções, incluindo cada uma uma série de espécies (HOUBRAKEN; DE VRIES; SAMSON, 2014; HUBKA et al, 2015).

Esses agentes são fungos oportunistas e estão adaptados a mudanças extremas no meio ambiente. Além disso, podem induzir adoecimento em uma pequena proporção dos muitos indivíduos expostos à inalação de seus conídios, isto é, por transmissão aérea (OHBA et al, 2012; KOUSHA et al, 2011; KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

A patogênese da infecção por *Aspergillus* está relacionada ao tamanho do inóculo, à virulência dos microrganismos inalados e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo importantes para o desenvolvimento da doença. De forma geral, em pacientes imunocompetentes, os esporos inalados são eliminados pelo clearance mucociliar e também pelos neutrófilos e macrófagos pulmonares, limitando a proliferação e disseminação de *Aspergillus*. Na dependência de presença de doenças pulmonares de base ou redução da função imune, as apresentações clínicas podem variar desde forma colonizante a formas graves da doença (OHBA et al, 2012).

A resposta inicial do pulmão às espécies de fungos inicia-se nas vias respiratórias superiores, com uma camada de muco no topo das células epiteliais ciliadas que capturam e invertem a direção do fungo. Outro subconjunto de células epiteliais especializadas contribui para o potencial antimicrobiano do pulmão com a secreção de muco, surfactantes e agentes peptídeos antimicrobianos, atraindo células imunes mais especializadas, contribuindo para a depuração fúngica (WIESNER; KLEIN, 2017; BIGNELL et al, 2018). As células epiteliais alveolares e macrófagos alveolares contribuem para a depuração dos pequenos esporos de fungos e fragmentos por fagocitose (CRAMER; RIVERA; HOHL, 2011; MARGALIT;

KAVANAGH, 2015). Anormalidades nessas funções de defesa dos pulmões, colaboram com a persistência do fungo, colonização e desenvolvimento de doença (GAGO; DENNING; BOWYERT, 2019).

Foi demonstrado em um modelo experimental que a gravidade da deficiência imunológica do hospedeiro é refletida diretamente por diferentes graus de germinação de *Aspergillus*, invasão do tecido e, portanto, gravidade da infecção. Em um modelo animal, a atividade de granulócitos foi identificada como o principal fator protetor contra invasão tecidual (SCHWEER et al, 2014).

Por ser *A. fumigatus* um agente ubíquo e o ser humano estar exposto frequentemente a esse fungo (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013), além de apresentar esporos muito pequenos, isso facilita a deposição ao longo das vias aéreas com muitos esporos atingindo os alvéolos. Quando o hospedeiro é saudável, os conídios são facilmente eliminados do pulmão por defesas imunológicas (HOHL; FELDMESSER, 2007). Em alguns pacientes, principalmente aqueles com cavidades nos pulmões, *A. fumigatus* pode evitar a resposta do sistema imunológico do hospedeiro e colonizar ou invadir as vias aéreas, levando à doença (KOSMIDIS; DENNING, 2015).

APC ocorre de forma frequente em pacientes com alteração pulmonar estrutural, como pacientes que apresentam cavitação. *A. fumigatus* pode colonizar e crescer em uma cavidade danificando o parênquima circundante. A apresentação de APC vai depender do grau de imunossupressão dos pacientes (por exemplo, com AIDS, tratamento com corticosteroide ou diabetes) que podem desenvolver uma aspergilose subaguda invasiva (APSI) e apresentam uma evolução dos sintomas e da doença em 1-3 meses, geralmente com cavidades ou nódulos crescentes com ou sem cavitação (DENNING et al, 2016). A aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC) se manifesta em pacientes que não são gravemente imunocomprometidos, geralmente complicando outras condições, como tuberculose. Nesse caso, a evolução da doença é lenta e o crescimento de *A. fumigatus* fica confinado à parede de uma cavidade pulmonar, com uma reação inflamatória crônica. Uma bola fúngica (aspergiloma) pode aparecer na cavidade à medida que o crescimento do fungo se destaca da parede da cavidade. Granulomas são ocasionalmente encontrados em conjunto com um infiltrado de células inflamatórias crônicas levando à fibrose pleural (KOSMIDIS; DENNING, 2015; DENNING et al, 2016).

2.2.2 Epidemiologia e fatores de risco

Estima-se que aproximadamente 3 milhões de pessoas apresentem APC no mundo, e que 1,2 milhões de pessoas tenham APC como uma complicação de seqüela de TBP. Isso demonstra a extensão da doença de forma global, como um problema de saúde pública (BARAC et al, 2019).

O Brasil encontra-se entre os 30 países que concentram mais de 80% dos casos de TB no mundo (WHO, 2019) e apresenta uma incidência de 41/100.000 habitantes. Estima-se que APC ocorra em 4,9 a 6,3% de todos os casos de TBP tratados e em aproximadamente 26% dos casos com uma cavidade residual (PAGE et al, 2019).

Entre os 7,7 milhões de pacientes tratados para tuberculose pulmonar a cada ano, 20 a 30% permanecem com cavitação residual (WHO, 2017). Entre os pacientes com cavitação residual, 6,5% apresentarão APC a cada ano, com uma taxa de letalidade entre 38-80% em 5 anos. Aplicando-se estimativas de novos casos de APC em pacientes com e sem cavitação residual, em torno de 112.000 a 160.000 pessoas desenvolverão APC a cada ano, após o término do tratamento para tuberculose (PAGE et al, 2019).

A incidência e prevalência de APC são pouco conhecidas e provavelmente subestimadas, em parte devido APC ocorrer em pacientes com TBP ativa, assim como em uma seqüela de TBP prévia, ou com uma complicação de outra desordem pulmonar com sintomas semelhantes à TBP, e incorretamente diagnosticado e tratado como TBP (DENNING et al, 2018).

Os dados atualmente conhecidos sobre prevalência de APC podem variar com diferentes métodos diagnósticos conforme a seguir: 1) 20% de aspergilomas em 544 britânicos com cavidades residuais tratados previamente para TB (BRITISH TUBERCULOSIS ASSOCIATION, 1968); 2) 9,8% e aspergiloma em 5,4% de pacientes durante 2 anos de seguimento, indicando uma taxa anual de desenvolvimento de aspergiloma de 2,7%, com identificação de anticorpos específicos para *Aspergillus* (PAGE et al, 2019); 3) 8,3% de 350 pacientes no Brasil, predominantemente tratados para TB, com anticorpos específicos para *Aspergillus* e RX tórax (FERREIRA-DA-CRUZ et al, 1988); 4) 23-25% de pacientes tratados para TB na Índia, 5) 19% de 226 pacientes japoneses com TB ativa ou tratada e 6) 9% de 101 pacientes HIV-positivos completando tratamento de TBP em Kampala, Uganda. 7) APC provável em 8,7% de 208 pacientes completando tratamento para TB na Nigéria por Raio-X tórax e realização de sorologias e 8) 2,4% para aspergiloma e

11,3% para APCC de 124 pacientes HIV-negativos com TB ativa ou tratada no Irã (PAGE et al, 2019; HEDAYATI et al, 2015). Estudos subseqüentes demonstraram que o aspergiloma está presente apenas em um terço dos casos de APC (PAGE et al, 2019).

Nos últimos 5 anos, o portal *Leading International Fungal Education* (LIFE) tem auxiliado no cálculo de estimativa de graves infecções fúngicas em vários países. Uma alta prevalência de APC tem sido estimada nas Filipinas, Paquistão e Romênia (78, 70 e 59 por 100.000, respectivamente). A prevalência de APC em diferentes regiões parece estar aumentando, provavelmente devido ao diagnóstico mais preciso e publicações de consensos de critérios diagnósticos (BARAC et al, 2019).

A APC está associada a uma taxa de letalidade de pelo menos 15% no primeiro ano após o seu diagnóstico, frequentemente resultante de hemorragia pulmonar maciça. Estima-se que esteja associada com a morte de mais de 450.000 pacientes em todo o mundo (BROWN et al, 2012) e com uma alta taxa de letalidade em cinco anos associada à APCC 38-80% (OHBA et al, 2012; LOWES et al, 2017; PAGE et al, 2019).

Estudo sobre fatores preditores de mortalidade, encontraram taxas de sobrevivência de 86%, 62% e 47% com 1, 5, e 10 anos de doença, respectivamente (LOWES et al, 2017). Vários fatores de risco para óbito foram identificados: infecção por micobactéria não tuberculosa (NTB), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), envolvimento pleural, doença cavitária, presença de um aspergiloma, respiração curta, baixa atividade física e pequena massa corporal. Esses fatores poderiam funcionar como fatores prognósticos para APC (LOWES et al, 2017; SALZER; CORNELLY 2017).

2.2.3 Manifestações clínicas

A maioria dos pacientes com APC experimentam sinais e sintomas clínicos, embora alguns sejam assintomáticos e demonstrem somente progressão radiológica. O principal sinal de alarme é hemoptise que se desenvolve em aproximadamente 12%–43% de pacientes com APC e varia de raias de sangue no escarro à maciça e fatal hemoptise. Outros sintomas característicos são dor torácica (moderada, mas persistente) desconforto ou aperto experimentado por até 37% dos pacientes. Perda de peso e fadiga também são comuns, embora não universais. Tosse (usualmente produtiva) e dispneia são comuns, mas não suficientes para distinguir APC de outras desordens pulmonares, incluindo TBP pulmonar. Febre ou hipertermia são incomuns em pacientes com APC e se presente, podem indicar um

diagnóstico alternativo. Sudorese noturna ou diária é ocasionalmente relatada, mas não é discriminatória (DENNING et al, 2018).

A tosse é o sintoma mais comum em pacientes com APC (HOU et al, 2017), mas também podem apresentar dispneia, produção de expectoração e dor torácica. A hemoptise, que pode ser fatal, é vista em mais da metade dos pacientes com APC e acredita-se ser resultado da alta vascularização pela artéria brônquica em torno da área envolvida. Febre, perda de peso e suores noturnos são mais comuns em APCC, APFC e APSI, e geralmente estão ausentes em pacientes com aspergiloma simples e nódulos de *Aspergillus*. Uma fração de pacientes com APC, particularmente aqueles com nódulos de *Aspergillus*, podem ser assintomáticos (HOU et al, 2017; DENNING et al, 2016). Velocidade de sedimentação de hemácias (VHS) e a proteína C-reativa de alta sensibilidade podem estar elevados em pacientes com APC, especialmente em APCC, APFC e APSI (HOU et al, 2017).

Por serem os sintomas inespecíficos e insidiosos, um alto índice de suspeita é exigido em pacientes com fatores predisponentes tais como TB prévia com cavidade residual, DPOC grave, tratamento prévio para neoplasia pulmonar ou NTM (BARAC et al, 2019).

O painel de consenso europeu baseado na opinião de especialistas exige para o diagnóstico de APC pelo menos mais do que um sintoma persistente por três meses e progressão radiológica. Dois outros cenários que também qualificam o diagnóstico de APC são evidência radiológica de um simples aspergiloma (com ou sem sintomas) e aparência radiológica característica sem sintomas, mas demonstrando definitiva progressão radiológica (DENNING et al, 2018).

APC apresenta 5 formas clínicas: 1. Nódulo de *Aspergillus*, 2. Aspergiloma pulmonar simples, 3. Aspergilose pulmonar cavitária crônica, 4. Aspergilose pulmonar fibrosante crônica, 5. Aspergilose pulmonar invasiva subaguda (DENNING et al, 2016).

A forma mais comum de APC é aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC). Apresenta-se com cavitação progressiva e sintomas incluindo perda de peso, fadiga, tosse, dispneia, desconforto torácica e hemoptise (PAGE et al, 2019).

Na ausência de terapia, a APCC pode progredir para aspergilose pulmonar fibrosante crônica (APFC), com destruição importante do pulmão (PAGE et al, 2019).

Um aspergiloma é uma bola fúngica que consiste em hifas de *Aspergillus*, fibrina e outros detritos, contidos em uma cavidade pulmonar previamente formada. É extremamente característico de APC e pode ser visto em todas as formas da doença exceto em nódulos de *Aspergillus* (DENNING et al, 2016). Acredita-se que surja após colonização da cavidade por espécies de *Aspergillus* (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018), O aspergiloma simples e

os nódulos de *Aspergillus* são formas menos graves de APC e podem ser clinicamente inexpressivos (DENNING et al, 2016).

Aspergilose pulmonar subaguda invasiva (APSI), anteriormente conhecida como aspergilose pulmonar necrosante crônica, é uma doença pulmonar localmente destrutiva e tende a se manifestar em pacientes levemente imunocomprometidos e progride mais rapidamente entre um a três meses (MULDOON; STREK & PATTERSON, 2017). Embora a APSI seja comumente agrupada sob APC, é diagnosticada e tratada de forma semelhante à AI (DENNING et al, 2016)

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de aspergilose é baseado na identificação do microrganismo *Aspergillus* de espécimes respiratórios, junto com detecção de anticorpos anti-*Aspergillus* e/ou antígenos circulantes para *Aspergillus* no soro. O principal agente identificado é *A. fumigatus*, porém outras espécies podem ser encontradas. A sua presença em secreções respiratórias não discrimina entre colonização e infecção (UFFREDI et al, 2003).

As definições de casos de consenso existentes para APC são arbitrárias e baseadas na opinião de especialistas (PAGE et al, 2019). A *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID), *European Respiratory Society* (ERS) e *European Confederation of Medical Mycology* (ECMM), estabeleceram os seguintes critérios diagnósticos: (i) presença de uma ou mais cavidades com ou sem bola fúngica ou nódulos presentes em imagem torácica por um tempo ≥ 3 meses, (ii) evidência microbiológica de infecção por *Aspergillus* ou uma resposta imunológica a *Aspergillus* spp; e (iii) exclusão de diagnósticos alternativos (DENNING et al, 2016).

A evidência microbiológica de infecção por *Aspergillus* pode ser realizada por microscopia direta, cultura ou exame histopatológico de amostras obtidas de escarro, líquido de lavado broncoalveolar (LBA) e fragmentos de tecido pulmonar.

Microscopia direta de escarro pode mostrar hifas hialinas septadas morfológicamente consistentes com *Aspergillus* spp.

Apesar da quantidade substancial de *Aspergillus* spp. nas cavidades dos pacientes com APC, a positividade da cultura em meios específicos nas amostras de escarro é menor que o esperado (41% a 81%). Uma razão para essa menor sensibilidade é a inoculação de

placas de cultura com volumes muito pequenos de escarro, como é feito para a cultura bacteriana. Culturas negativas podem refletir uma incapacidade do fungo em se adaptar às condições *in vitro*, apesar da aparente facilidade com que a contaminação ambiental ocorre em laboratório (DENNING et al, 2018). Culturas falso-positivas em escarro ocorrem como resultado de contaminação laboratorial.

Dadas as altas taxas de colonização de *Aspergillus* na população, espécies de *Aspergillus* isoladas de amostras de LBA obtidas por broncoscopia têm um valor diagnóstico mais alto do que do escarro (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

O exame histopatológico em amostras de tecido pulmonar pode revelar hifas hialinas septadas, e quando invadindo o parênquima pulmonar, confirmam o diagnóstico de APSI.

Evidências imunológicas para o diagnóstico da APC são baseadas na detecção de antígenos e anticorpos específicos contra *Aspergillus*, respectivamente.

Testes sorológicos de precipitinas e detecção de anticorpos são indispensáveis para o diagnóstico e são considerados o melhor método não invasivo para o diagnóstico de APC (UFFREDI et al, 2003; van TOORENENBERGEN, 2011). Esses testes podem ser positivos em acima de 90% com precipitinas ou na detecção de imunoglobulinas anti-*Aspergillus* (TAKAZONO; IZUMIKAWA, 2018; DENNING et al, 2016). Em pacientes apresentando *Aspergillus* na árvore respiratória, a detecção de anticorpos específicos no soro pode diferenciar colonização de infecção, com um valor preditivo positivo de 100% para identificação de infecção (LONGBOTTOM; PEPYS, 1964).

Inicialmente anticorpos contra *A.fumigatus* foram determinados por detecção de precipitinas usando teste de imunodifusão dupla (IDD) ou a técnica de contraimunoelctroforese (CIE) (JHUN et al, 2013; WARD; KOHLER, 1973; COLEMAN; KAUFMAN, 1972) com uma sensibilidade de 89,3% (van TOORENENBERGEN, 2011) e especificidade de 100% (PATTERSON et al, 2016).

Esses métodos (IDD e CIE) consomem muito tempo, exigindo um trabalho intenso e grandes extratos de *A. fumigatus* e de soro de pacientes, além de promover somente resultados semiquantitativos (UFFREDI et al, 2003). Na prática, técnicas de precipitação tem sido substituída por testes de detecção de anticorpos IgG específicos para *Aspergillus* por ensaio imunoenzimático (ELISA) (BARTON, 2010). Este tem sido considerado o teste mais rápido e sensível (McINNES et al, 2018) produzindo resultados quantitativos com extratos menores para *A. fumigatus* e soro de pacientes por teste, além de ser facilmente automatizado (UFFREDI et al, 2003), e tem sido fortemente recomendado pela *Infectious Diseases Society of America - IDSA* (PAGE; RICHARDSON; DENNING, 2018).

Apesar de sua importância, sorologias pelo teste ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos para *Aspergillus*, ainda não apresentam uma acurácia diagnóstica para APC; diferenças significativas em sensibilidade, especificidade e coeficientes de variação necessitam ser explorados com coortes de pacientes bem caracterizados (DENNING et al, 2016).

A comparação de testes ELISA in-house entre laboratórios é muito difícil devido ao uso de preparações não padronizadas de *A.fumigatus* e os resultados são obtidos em várias unidades quantitativas que também são escolhidas sem padronização. Por essa razão, testes comerciais com preparações e concentrações padronizadas estão sendo utilizados (UFFREDI et al, 2003).

Atualmente, há vários testes comerciais tais como placas de ELISA para anticorpos específicos para *Aspergillus* IgG produzidos por Serion® (Alemanha), IBL® (Alemanha / EUA), Dynamiker® / Bio-Enoche® (China), Bio-Rad® (França), Bordier® (Suíça) e Omega / Genesis® (Reino Unido), assim como sistemas automatizados IgG específicos tais como Immunolite-Siemens® (Alemanha) e ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific / Phadia), que são testes imunoenzimáticos de fluorenzima variantes de ELISA. A principal limitação desses testes é que eles somente detectam anticorpos contra *A. fumigatus*. Em alguns países tais como Índia e Japão, 40% dos pacientes com APC são infectados com cepas não-*fumigatus* (TAKAZONO; IZIMIKAWA, 2018).

Tem sido demonstrado que o IgG específico do Siemens Immulite *Aspergillus* é o ensaio comercial de melhor desempenho para o diagnóstico de APC. Tem uma sensibilidade de 93,4% para casos de APC no Reino Unido e especificidade de 98,7% contra controles saudáveis ou 97,9% contra controles de Uganda com tuberculose pulmonar tratada com um cut-off de 20 mg / L, independentemente do status de HIV (PAGE et al, 2019).

A realização de um teste para APC com IgG específico para *Aspergillus* tem sido sugerido que deva ser rotineiro em todos os pacientes com tosse recorrente, hemoptise ou perda de peso após o tratamento da tuberculose pulmonar, independentemente do status de HIV ou tempo de conclusão da terapia contra tuberculose. Aqueles com níveis elevados devem ter exames de imagem, preferencialmente com TC de tórax, para confirmar o diagnóstico. Como APC imita a apresentação de testes de tuberculose pulmonar, também deve fazer parte de investigações de rotina em qualquer paciente onde o tratamento empírico para tuberculose com escarro negativo esteja sendo considerado (PAGE et al, 2019).

Um nível elevado de *Aspergillus* IgG é consistente com várias condições, incluindo rinossinusite por *Aspergillus*, ABPA, bronquite por *Aspergillus* (principalmente em fibrose

cística e bronquiectasia), APSI, recuperação de AI e pneumonia adquirida na comunidade. Como um nível elevado de IgG é altamente sensível, mas não específico para a APC, o diagnóstico da APC deve incluir sintomas compatíveis e anormalidades radiológicas (DENNING et al, 2018).

Testes moleculares para a detecção *Aspergillus* spp por Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) no escarro é mais sensível (em torno de 80%) do que cultura, porém a *performance* do PCR depende da qualidade e possibilidade de quantificação da amostra de escarro. Ensaio moleculares para *Aspergillus* spp. não estão disponíveis rotineiramente na maioria dos centros médicos em todo o mundo, especialmente nos países de baixa e média renda (DENNING et al, 2018).

A detecção de galactomanana (GM), um antígeno carboidrato produzido por *Aspergillus* spp, é útil para o diagnóstico de AI, pois é frequentemente detectável no soro e no LBA. Como a invasão tecidual não ocorre em pacientes com APC, detecção de GM em lavado broncoalveolar tem um melhor desempenho diagnóstico do que o soro e parece ser uma valiosa ferramenta diagnóstica, no entanto, o ponto de corte para positividade não está estabelecido (DENNING et al, 2018; SHIN et al, 2014; IZUMIKAWA et al, 2012; KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

Um novo exame para detecção de diferentes antígenos proteicos específicos para *A. fumigatus*, baseado em ensaio simples de fluxo lateral vem sendo comercializado, mas não há dados suficientes sobre sua utilidade em escarro para pacientes com APC. Parece que esse exame é útil em LBA. O p-1,3-D-glucan é liberado por *Aspergillus* spp. (e muitos outros fungos) porém é menos específico e não é mais sensível que a galactomanana sérica em APC (DENNING et al, 2018).

As evidências radiológicas, por radiografia simples e, ou TC de tórax, são particularmente importantes no diagnóstico de APC e na classificação de suas formas.

As características radiológicas da APC são de forma geral uma combinação de infecção por *Aspergillus* e a condição pulmonar subjacente. Elas podem variar de uma nova cavidade ou expansão de cavidades preexistentes, de parede de espessura variável a infiltrados pericavitários, bronquiectasias adjacentes, espessamento pleural e derrames (KANJ, ABDALLAH, SOUBANI, 2018).

A tomografia tem apresentado maior sensibilidade do que radiografia de tórax para demonstrar várias características, como identificação de mais de uma bola fúngica, nódulos pulmonares, múltiplas cavidades, e doença em ápices e espaço retrocardíaco (DESAI et al, 2015).

A angiotomografia pode fornecer uma visualização detalhada do parênquima pulmonar e dos vasos, especialmente quando hemoptise é motivo de preocupação (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

Para o nódulo de *Aspergillus* a TC de tórax é mais sensível para a sua detecção do que uma radiografia de tórax (MULDOON et al, 2016). Pode variar em diâmetro, ser único ou múltiplos sólido ou apresentar cavitação central. Podemos encontrar nódulos maiores (> 3 cm) descritos como massas e que podem também ser atribuídas à infecção por *Aspergillus* (DENNING et al, 2018).

Para o aspergiloma simples, geralmente observamos que a apresentação é única, em uma área localizada do pulmão, com poucos ou nenhum sintoma. Embora a presença de uma bola fúngica seja altamente sugestiva de um aspergiloma como uma manifestação de APC, confirmação microbiológica é requerida para um diagnóstico definitivo (DENNING et al, 2018). A bola fúngica é tipicamente redonda, sólida e móvel, mas também pode ser fixa e irregular (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018). O parênquima pulmonar e a pleura adjacente geralmente encontram-se normais no aspergiloma simples.

O espaço aéreo em forma de crescente, que separa a bola fúngica da parede da cavidade, chama-se sinal de Monod (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

A bola fúngica está ausente na maioria dos casos de APC, então a associação de exames sorológicos e outras imagens tomográficas são importantes para o diagnóstico confiável dos casos de APC, que raramente estão disponíveis em locais com poucos recursos. Na ausência de bola fúngica, a APC pode ser falsamente diagnosticada como TB pulmonar, já que esses pacientes preenchem os critérios diagnósticos da OMS para tuberculose com baciloscopia negativa. Segundo a OMS em 2014, em torno de 2,2 milhões, (cerca de 43% de 5,2 milhões de casos de TB pulmonar, tiveram seu diagnóstico somente por sintomas clínicos ou foram negativos à baciloscopia (WHO, 2015). Dos pacientes com baciloscopia negativa, somente 21% a 40% dos casos de TBP apresentaram cultura positiva (HARGREAVES et al, 2001; NAKIYINGI et al, 2015). Em um estudo de coorte, o RX tórax foi pouco sensível para o diagnóstico de APC e poderia ser excluída por esse método de imagem, porém pode ser diagnosticada com acurácia aceitável se a dosagem de IgG específica para *Aspergillus* também fosse realizada nesses casos (PAGE et al, 2019).

A característica principal de APC é a presença de mais de uma cavidade que pode variar em tamanho (grande ou pequena); o aparecimento de novas cavidades está relacionado com a necrose central das consolidações (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

As cavidades na APCC são mais frequentemente espessas, enquanto as do aspergiloma simples e da APSI são mais frequentemente finas e junto à pleura. As cavitações podem expandir e coalescer durante a progressão da infecção (DENNING et al, 2018; KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

As cavidades observadas na APC são frequentemente localizadas na zona pulmonar superior e podem simular TB, além de poderem conter bolas fúngicas. (DENNING et al, 2018; KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018). Uma apresentação característica de APC é progressão lenta de achados por meses ou anos, por outro lado, a infecção por TB pulmonar progride rapidamente (DENNING et al, 2018).

Em alguns casos, um nível líquido pode ser visível em cavidades, que podem ser positivas para *A.fumigatus* ou em menor frequência, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e outros patógenos. Nível líquido em cavidade pode ser consistente com APC mas pode também representar outra infecção secundária (DENNING, 2001).

Nas imagens tomográficas podemos observar o crescimento do material contendo *Aspergillus* dentro da cavidade ao longo da parede, resultando em uma aparência irregular da borda interna, o que não pode ser observado na radiografia de tórax. A cavidade pode apresentar opacidades lineares representando crescimento fúngico que foram destacadas da parede da cavidade (GOTWAY et al, 2002).

Podem ter aspecto de esponjas podendo ser descritas como bola fúngica contendo ar (ROBERTS; CITRON; STRICKLAND, 1987). Podem se destacar da parede da cavidade e podem ser móveis. Com a terapia antifúngica, as esponjas resolvem mais facilmente do que um aspergiloma (DENNING et al, 2018).

O espessamento pleural é muito comum em pacientes com APC e útil para o diagnóstico. É uma apresentação muito sugestiva de APC e raramente é encontrada em pacientes com TB ou outras cavidades fúngicas (JUDE et al, 2014; JEONG; LEE, 2008).

A infiltração pericavitária está relacionada com alterações inflamatórias adjacentes às cavidades em pacientes com APC, mas não invasão por hifas. Indica APC ativa e necessidade de tratamento (IZUMIKAWA et al, 2007).

Algumas apresentações são difíceis de serem diferenciadas, como APCC e APSI. A evolução das lesões pode ajudar a caracterizar a apresentação clínica pois em APSI as lesões progrigem rapidamente, em poucas semanas, e APCC geralmente apresenta-se com progressão lenta e pode levar vários meses para uma mudança significativa ser observada (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

2.2.5 Tratamento

Pacientes com aspergiloma simples, que estão assintomáticos e clinicamente estáveis por um período de seis meses a dois anos, podem ser acompanhados de perto e não necessitam de terapia antifúngica. Em menos de 10% dos casos, aspergilomas podem apresentar resolução espontânea (PASSERA et al, 2012).

Para pacientes com um único aspergiloma, que estão sintomáticos, especialmente apresentando hemoptise com potencial risco de vida, ressecção cirúrgica está recomendada como cura definitiva, assim que o paciente apresentar função pulmonar adequada (DENNING et al, 2016; PABST et al, 2013; SCHWEER et al, 2014). A cirurgia está contraindicada em pacientes com grave alteração da função pulmonar devido deterioração dessa função no pós-operatório ou fístula broncopleural, que pode ser fatal (HE et al, 2019; BONGOMIN et al, 2020)

Há relatos de APCC simulando aspergiloma simples, devendo a cirurgia ser considerada com cuidado, não sendo totalmente sem riscos. A broncoscopia intervencionista pode ser utilizada para remoção de aspergiloma único com resultado favorável (STATHER et al, 2013). Tem sido descrito relato de óbitos em pacientes sintomáticos e complicações pós-operatórias podem chegar a 40% (REGNARD et al, 2000).

Várias complicações da própria doença, como evolução para fístulas ou até mesmo hemoptise maciça, podem exigir intervenções cirúrgicas ou embolização arterial brônquica. Um grande número de casos com hemoptise pode ser conduzida de maneira conservadora. Apesar da embolização arterial ser eficaz no controle imediato pouco se sabe sobre sua eficácia a longo prazo (SCHWEER et al, 2014).

A cirurgia pode ser curativa em pacientes selecionados com doença localizada e pode ser realizada com segurança em ambientes com poucos recursos. O tratamento com medicamentos azólicos orais pode prevenir a progressão clínica e radiológica (PAGE et al, 2019).

A terapia antifúngica tem um benefício limitado no tratamento do aspergiloma e está reservado para pacientes sintomáticos que não são elegíveis para o tratamento cirúrgico, assim como para aqueles que são imunocomprometidos ou apresentam progressão radiológica (EL-BABA; GAO; SOUBANI, 2020; CAMPBELL et al, 1991; LEBEAU et al, 1994; DUPONT, 1990).

Apesar de APC ser uma doença de destruição pulmonar progressiva, o tratamento sistêmico com agentes antifúngicos deve ser levado em consideração. IDSA recomenda o uso de itraconazol ou voriconazol de administração oral para APC (WALSH et al, 2008). Alguns estudos também demonstram que terapia antifúngica pode não afetar a sobrevivência de APC, necessitando estudos mais amplos para estabelecer estratégias de terapia padrão (OHBA et al, 2012).

Pacientes com APCC ou APFC que estão assintomáticos, com doença estável, podem não necessitar de terapia antifúngica, mas deveriam ser rigorosamente monitorizados com parâmetros objetivos, como exames de imagem, de função pulmonar e títulos de anticorpos IgG anti-*Aspergillus*. Para aqueles que são sintomáticos com doença progressiva por imagem ou sorológica, terapia antifúngica está indicada (EL-BABA; GAO; SOUBANI, 2020).

O itraconazol é a droga de escolha e age interferindo com a síntese de membrana celular de *Aspergillus* spp suscetível por inibição da enzima lanosterol 14 alfa-dimetilase, prevenindo a conversão do ergosterol pelo lanosterol (MAGHRABI; DENNING, 2017).

A primeira linha de tratamento para APCC é itraconazol na dose de 200mg via oral duas vezes ao dia ou voriconazol 150 a 200mg duas vezes ao dia, ambos necessitando monitorização dos níveis séricos, no entanto não está disponível na maioria dos centros de tratamento. O objetivo da terapia é melhorar ou prevenir sintomas e reduzir a progressão de fibrose (PATTERSON et al, 2016; TASHIRO et al, 2019; BARAC et al, 2019). Para pacientes com doença limitada, tratamento por pelo menos 6 meses é suficiente. Para aqueles com doença bilateral ou extensa, 24 meses ou tratamento por toda a vida pode ser requerido para evitar recidiva após a descontinuação da terapia (OLADELE et al, 2017).

A recorrência da hemoptise pode ser um sinal de falência de tratamento, mas também pode representar uma rede vascular persistente que o tratamento antifúngico somente não possa resolver (OSAKI et al, 2000).

Resistência ou eventos adversos como intolerância ocorrem em mais de 50% dos pacientes (KOSMIDIS; DENNING, 2015).

A maioria das recomendações de tratamento de APC é baseada em estudos de coortes (retrospectivos ou prospectivos) ou relatos de casos. Dois estudos prospectivos para terapia oral foram realizados. Um estudo randomizado controlado de dois antifúngicos intravenosos (KOHNO et al, 2010) mostrou que micafungina foi tão eficaz quanto voriconazol e significativamente mais segura para início de tratamento. Outro estudo randomizado com terapia com azólico oral contra nenhuma terapia antifúngica mostrou que o uso de

itraconazol foi mais eficaz do que somente suporte clínico e apesar da ocorrência de eventos adversos, nenhum tratamento foi descontinuado (AGARWAL et al, 2013).

Drogas endovenosas não azólicas, isoladas ou em combinação com azólicos, são o último recurso após falha, resistência aos azólicos ou toxicidade à droga, mas também pode ser utilizado em situações de doença grave. São incluídas como opção a anfotericina B ou uma equinocandina, usualmente micafungina ou caspofungina (MAGHRABI; DENNING, 2017; PATTERSON et al, 2016).

Lobectomia pulmonar pode ser considerada em APCC com hemoptise importante ou falha terapêutica, mas está associada com uma alta taxa de complicação pós-operatória e a possibilidade de recidiva (BRIK et al, 2008; FARID et al, 2013).

Posaconazol pode ser uma alternativa potencial (FELTON et al, 2010). Longo tempo de tratamento com itraconazol pode ser benéfico para pacientes de forma geral, com impacto limitado em dispneia, nos casos de progressão de APCC para APFC (DENNING et al, 2003).

Há recomendação para tratamento de APSI como AI (DENNING et al, 2016). Alguns estudos têm demonstrado resposta com longo tempo de tratamento com itraconazol via oral (CARAS; PLUSS, 1996; SARACENO et al, 1997). Voriconazol tem apresentado maior eficácia em pacientes com APSI do que com APCC (CADRANEL et al, 2012; SAMBATAKOU et al, 2006; CAMUSET et al, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a prevalência de aspergilose pulmonar crônica (APC) em pacientes com tuberculose pulmonar (TBP) e acurácia dos testes sorológicos

3.2 Específicos

- a) Revisar a evidência científica publicada sobre a acurácia de testes sorológicos para diagnóstico de APC;
- b) Estimar a prevalência de APC em pacientes com TBP em dois hospitais (HUMAP e HRMS);
- c) Avaliar associações entre variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e tomográficas e a presença de APC;
- d) Avaliar parâmetros de acurácia dos testes diagnósticos de APC pelos testes de ELISA e IDD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos utilizados estão descritos nos artigos, que serão apresentados a seguir.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na presente tese serão apresentados em forma de um artigo publicado e um manuscrito a ser submetido à publicação:

5.1 Artigo 1 – Accuracy of serological tests for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis: a systematic review and meta-analysis.

5.2 Artigo 2 (Manuscrito) – Prevalência de aspergilose pulmonar crônica e acurácia de testes sorológicos em pacientes com tuberculose na região Centro-Oeste do Brasil.

Artigo 1

ACCURACY OF SEROLOGICAL TESTS FOR DIAGNOSIS OF CHRONIC
PULMONARY ASPERGILLOSIS: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-
ANALYSIS

PUBLICADO NO PERIÓDICO PLOS ONE EM MARÇO DE 2020.

5.1 Accuracy of serological tests for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis: a systematic review and meta-analysis

Abstract

Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) is a slow and progressive lung disease that develops in preexisting cavities of patients with tuberculosis sequel, presenting a high mortality rate. Serological tests like double agar gel immunodiffusion test (DID) or the counterimmunoelectrophoresis (CIE) test have been routinely used for CPA diagnosis in the absence of positive cultures; however, they have been replaced by enzyme-linked immunoassay (ELISA), with a variety of methods. This systematic review aims to compare the accuracy of the ELISA test with the reference test (DID and/or CIE) in CPA diagnosis. It was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). The study was registered in PROSPERO under the registration number CRD42016046057. We searched the electronic databases MEDLINE (PubMed), EMBASE (Elsevier), LILACS (VHL), Cochrane library, and ISI Web of Science. Gray literature was researched in Google Scholars and conference abstracts. We included articles with patients or serum samples from CPA patients who underwent two serological tests: ELISA (index test) and DID and/or CIE (reference test), using the accuracy of the tests as a result. Original articles were considered without a restriction of date or language. The pooled sensitivity, specificity, and summary receiver operating characteristic curves were estimated. We included 14 studies in the review, but only four studies were included in the meta-analysis. The pooled sensitivities and specificities were 0.93 and 0.97 for the ELISA test. For the reference test (DID and/or CIE), these values were 0.64 and 0.99. Analyses of summary receiver operating characteristic curves yielded 0.99 for ELISA and 0.99 for the reference test (DID and/or CIE). Our meta-analysis suggests that the diagnostic accuracy of ELISA is greater than that of the reference tests (DID and/or CIE) in early detection of CPA. Keywords: Meta-analysis. Systematic review. Serological tests, Immunodiffusion, Double agar gel immunodiffusion test, Immunoenzymatic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ELISA, DID, pulmonary aspergillosis.

Introduction

Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) is a slow and progressive lung disease caused by *Aspergillus* spp. that develops in preexisting cavities of patients with chronic respiratory diseases. Pulmonary tuberculosis is its main predisposing factor, with a global prevalence estimated at 1.2 million cases [1] and its prognosis is poor, with 38-85% mortality in five years [1,2].

CPA presents five clinical forms: 1. *Aspergillus* nodule, 2. pulmonary simple aspergilloma, 3. chronic cavitary pulmonary aspergillosis (CCPA), also called complex aspergilloma, 4. chronic fibrosing pulmonary aspergillosis (CFPA), and 5. subacute invasive pulmonary aspergillosis (SAIA) [3]. Aspergilloma is present in only one-third of patients with CPA [1,4].

The diagnosis of CPA is based on suggestive images, preferably CT scan, on evidence of microbiological infection by *Aspergillus* or on the presence of an immune response to this agent, maintained for at least 3 months [3].

Serologic tests are indispensable for the diagnosis in the absence of positive cultures and are considered the best noninvasive tests to diagnose this entity [5,6]. These tests may be over 90% positive with precipitins or in the detection of *Aspergillus* IgG [2,3].

In patients presenting *Aspergillus* in the respiratory tract, the detection of specific serum antibodies differentiates infection from colonization, with a positive predictive value of 100% for identification of infection [7]. Initially, antibodies against *Aspergillus fumigatus* were determined by detection of precipitins using the double agar gel immunodiffusion test (DID) or the counterimmunoelectrophoresis technique (CIE) [4,8,9] with a sensitivity of 89.3% [5] and a specificity of 100% [10].

These methods (DID and CIE) consume a lot of time, intense work, require relatively large extracts of *A. fumigatus* and patient serum, and provide only semiquantitative results [6].

The *Aspergillus* IgG antibody test is strongly recommended by the Infectious Diseases Society of America IDSA [11]. In practice, precipitation techniques have already been replaced by the *Aspergillus* IgG antibody detection test by enzyme-linked immunoassay (ELISA) [12]. This is considered the fastest and most sensitive test [13], producing quantitative results with lower extracts of *A. fumigatus* and patient serum by test, besides it is easily automated [6].

Despite its importance, serology for the detection of *Aspergillus* IgG by ELISA still does not reach a definitive conclusion on diagnostic performance for CPA, as significant differences in sensitivity, specificity and coefficient of variation need to be explored with cohorts of well-characterized patients [3].

It is very difficult to compare results from in-house IgG ELISA tests between laboratories because of the use of non-standard *A. fumigatus* preparations, and the results are obtained in various quantitative units that are also chosen without standardization. For this reason, commercial tests with standardized preparations and concentrations are being used [6]. Currently, we have commercial tests such as ELISA plates for *Aspergillus*-specific IgG antibodies produced by Serion (Germany), IBL (Germany / USA), Dynamiker / Bio-Enoche (China), Bio-Rad (France), Bordier (Switzerland) and Omega / Genesis (UK), as well as specific *Aspergillus* IgG automated systems such as Immunolite-Siemens (Germany) and ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific / Phadia), which are fluoroenzyme immunoassay variants of ELISA. The main limitation of these tests is the detection of antibodies only against *A. fumigatus* and in some countries such as India and Japan, non-*fumigatus* strains can reach up to 40% of patients with CPA [2].

Considering the variety of methods for detection of antibodies to *Aspergillus*, the use of precipitation tests due to their low cost and the absence of more precise options for serological diagnosis of CPA, the present study review on serological diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis, comparing the performance of the precipitation tests with the enzyme-linked immunoassay tests.

Materials and Methods

We conducted a systematic review of the literature in accordance with the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [14] and STARD 2015 [15]. A protocol for systematic review was developed and registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews - CRD42016046057. We used the Cochrane recommendations to report systematic reviews and meta-analyses of studies on diagnostic accuracy [16].

Eligibility criteria

We considered as inclusion criteria articles with population or serum samples from patients diagnosed with aspergilloma or chronic pulmonary aspergillosis that were submitted to the ELISA immunoenzymatic test (ELISA test) and to the double immunodiffusion gel agar and/or counterimmunoelectrophoresis test (DID and/or CIE). The accuracy of the tests was defined as primary outcome. Original studies were included without restriction of language, geographical location or date of publication. We excluded studies with children or animals and/or in *vitro*. We were unable to find an article in Japanese, which was selected for full article reading because it was not available in the international library commuting service.

Information sources and search strategies

The studies were searched in the following databases: MEDLINE (through PubMed), EMBASE (through Elsevier), LILACS (through VHL), Cochrane library and ISI Web of Science. Gray literature was researched in Google Scholars and congress abstracts. We submitted the search strategy performed until June 2019.

We used the following search strategy for Medline and adapted it for the other databases: pulmonary aspergillosis AND serologic test (and its synonyms). 1. ("Pulmonary Aspergillosis" [Mesh] or Aspergillosis, Pulmonary or Pulmonary Aspergillosis or Lung Aspergillosis or Aspergillosis, Lung or Aspergillosis, Lung or Bronchopulmonary Aspergillosis or Aspergillosis, Bronchopulmonary or Bronchopulmonary Aspergillosis or Aspergillosis, Bronchopulmonary or Aspergillose, Bronchopulmonary or Bronchopulmonary Aspergillose) AND ("Serologic Tests" [Mesh] or Serological Tests or Serological Tests or Serological Tests, Serological or Tests, Serologic or Serologic Tests or Serologic Tests or Serodiagnoses).

Study selection and data extraction

Titles were imported from EndNote Online and duplicate studies were removed. The remaining titles were independently reviewed by two authors (TFS and SMVLO), who selected the article abstracts, as well as defined the complete texts for evaluation. The divergences were resolved by a third expert reviewer (RPM). Two other authors (CEVC and

JV) performed independent evaluations of the complete articles and judged the methodological quality of the included studies using the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS-2) tool [17]. The divergences were resolved by consensus among the researchers.

Two reviewers (CEVC, JV) independently extracted the following data from each included study:

- Study characteristics: author, year of publication, country, design, and sample size.
- Population characteristics: according to the inclusion criteria
- Description of the index test and cut-off points;
- Description of the reference standard and cut-off points;
- QUADAS-2 items;
- Accuracy results obtained in each study to construct a diagnostic contingency (two-by-two table);

Assessment of methodological quality

For this review, we used the QUADAS-2 tool to assess the methodological quality of studies [17]. QUADAS-2 consists of four key domains: patient selection, index test, reference standard, and flow and timing. We assessed all domains for the potential of risk of bias (ROB) and the first three domains for concerns regarding applicability. Risk of bias is judged as “low”, “high”, or “unclear”. Two review authors independently completed QUADAS-2 and resolved disagreements through discussion.

Statistical analysis and data synthesis

We used data reported in the true positive (TP), false positive (FP), true negative (TN) and false negative (FN) format to calculate sensitivity and specificity estimates and 95% confidence intervals (CIs) for individual studies. Summary positive (LR+) and negative (LR-) likelihood ratios and summary diagnostic odds ratio (DOR) were obtained from the bivariate analysis. We used the clinical interpretation of likelihood ratios [18] as follows: conclusive evidence (LR+ >10 and LR- <0.1), strong diagnostic evidence (LR+ >5 to 10 and LR- 0.1 to <0.2), weak diagnostic evidence (LR+ >2 to 5 and LR- 0.2 to <0.5) and negligible evidence (LR+ 1 to 2 and LR- 0.5 to 1).

In studies where it was possible to calculate sensitivity and specificity for the ELISA test and DID and/or CIE, we calculated accuracy test and Youden's J statistic. The Youden's index values range from zero to one inclusive, with the expectancy that the test will show a greater proportion of positive results for the diseased group than for the control [19].

Studies were submitted to meta-analysis when three conditions were required: 1. sample size greater than 20; 2. sensitivity and specificity were available for the index and the reference tests; 3. control group was included in the analysis. We presented individual studies and pooled results graphically by plotting the estimates of sensitivity and specificity (and their 95% CIs), heterogeneity and receiver operating characteristic (ROC) space using Stata software. For the subgroup analysis we presented individual studies and pooled results in forest plots using Meta-DiSc software.

Investigations of heterogeneity

We investigated heterogeneity by subgroup analysis. First, we analyzed a subgroup with 3 studies that presented only healthy controls, maintaining high heterogeneity. Next, we analyzed a second subgroup with two most recent commercial testing studies and thus, we find the main source of heterogeneity: in-house and commercial tests. In-house tests have presented many technical differences. We considered an I² value close to 0% as having no heterogeneity between studies, close to 25% with low heterogeneity, close to 50% with moderate heterogeneity and close to 75% with high heterogeneity between studies [20].

Results

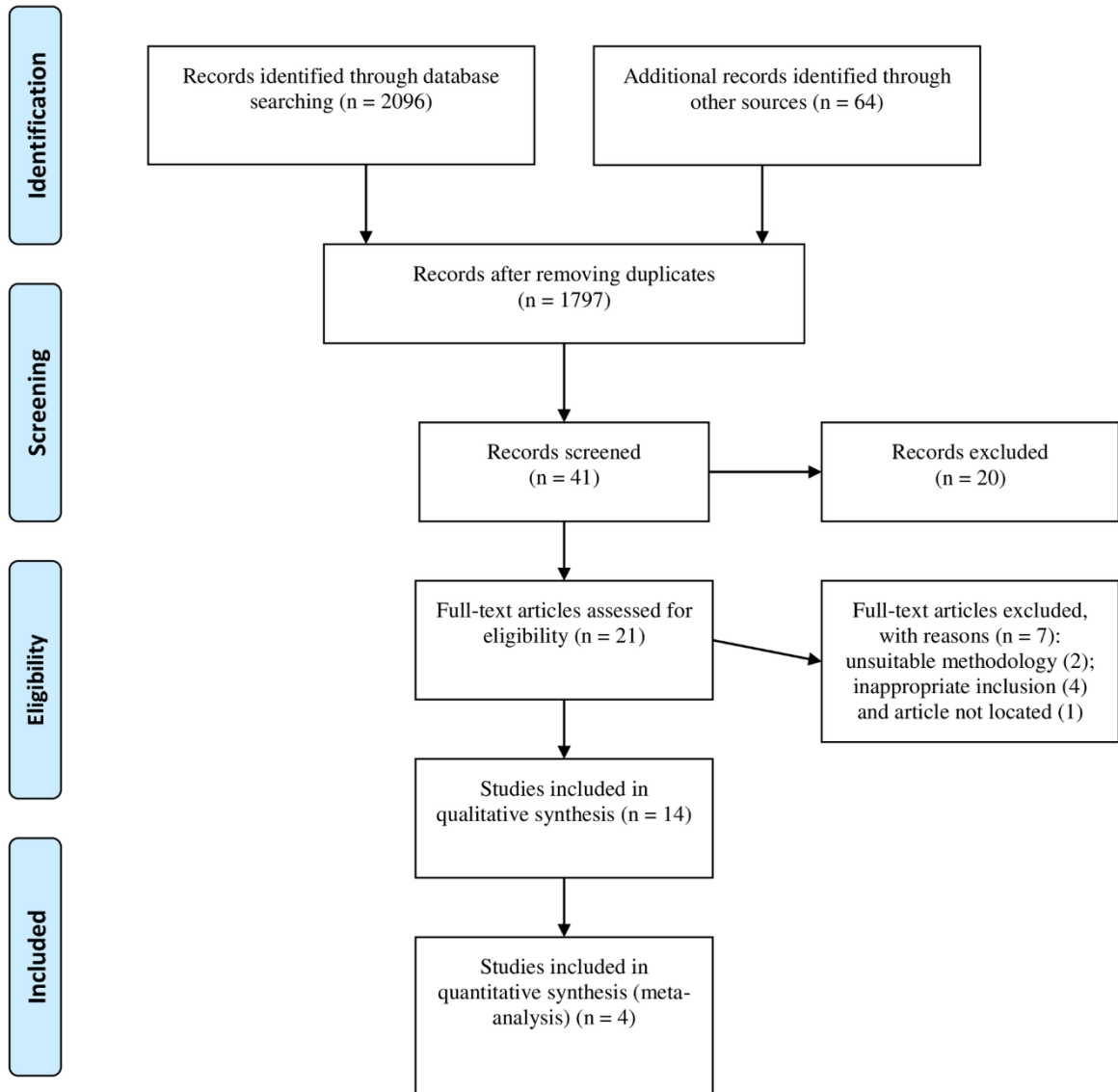
Study inclusion

A total of 2160 articles were identified. Among these, 2096 were found using a database, and 64 were identified from other sources (manual search). After removing duplicates, 1797 articles remained. After title/abstract exclusion, only 21 articles were submitted to a full text read, and 14 of them were included for the systematic review; only four studies were included for the meta-analysis (see Fig 1).

Fig1. Study flow diagram



PRISMA 2009 Flow Diagram



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.

Characteristics of the studies

The characteristics of the included studies are presented in S1Table. The earliest study was published in 1983 [21], and the five most current articles were published in 2015 [22], 2016 [23–25], 2018 [26] and 2019 [27]. Ten studies took place in five countries: Japan [24, 28], Brazil [22], United Kingdom [23, 27, 29], France [25, 30, 31], and India [26]. The study countries were not reported in four articles [21, 32–34].

Ten articles presented DID as the reference test [21, 22, 24, 26–28, 30, 32–34]. One article presented two reference tests, DID and CIE [34]. Four studies presented only CIE as the reference test [23, 25, 29, 31].

Some important differences that were observed after data extraction are highlighted. Seven studies were conducted using in-house ELISA tests [21, 22, 28, 30, 32–34], and seven using commercial tests [23–27, 29, 31]. For both in-house ELISA and commercial tests, different *Aspergillus* antigens and cut-off points were used, beyond those established by the manufacturer (S1 Table).

In one article, we could not identify the number of patients with CPA that was evaluated nor was it possible to extract data from the 2×2 table for DID and ELISA [28]. In two articles, it was not possible to recover the DID data [24, 30]. In another article, data were not obtained from CIE [31]. In yet another article [32], it was not possible to extract ELISA data. In one study [33], 20 sera from 13 patients were used; it was not possible to extract the accurate data per patient, and control group data were not presented for the ELISA test. In three articles, the tests did not include a control group [25, 27, 29]. In one article, the control group included patient samples showing the presence of DID precipitation lines; we did not consider this to be a control group [24]. Only one study used participants with disease as controls [26].

During the extraction of ELISA antigen concentration data, five studies using in-house tests presented concentrations varying from 0.1 mcg to 250 mcg per well [21, 22, 30, 33, 34]. These concentrations were not reported in two other articles [28, 32].

Additional differences were found between the in-house tests in studies, including ELISA secondary antibody dilution, with concentrations ranging from 1:100 to 1:300, when described [21, 22, 33, 34]. These dilutions were not reported in three articles [28, 30, 32]. When we evaluated the cut-off for ELISA, several descriptions were found with titers ranging from 1:100 to 1:800. We also found values in OD (optic density), AU/mL, in

percentage, and in absorbance. There was no comparable value in in-house tests [21, 22, 33, 34]. The cut-off was not described in three articles [28, 30, 32].

For the ELISA substrate, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) was found in two articles [21, 22], pNPP (alkaline phosphatase yellow) in two [33, 34], and OPD (*o*-phenylenediamine) in one [30]. The substrate was not reported in two articles [28, 32].

When extracting antigen concentration data from *A. fumigatus* in the studies using DID or CIE, we found variations between 5 mg/mL and 100 mg/mL [21, 29, 32–34]. We found values expressed in microliters in the following studies: 2 μ L [31], 10 μ L [25], and 20 μ L [23]. Different concentrations were used for somatic antigen [20 mg/mL] and antigen filtration [2 mg/mL] in one article [29]. The antigen concentrations data were not described in four articles [22, 27, 28, 30].

The studies with commercial ELISA tests used the following: ImmunoCap [23, 24, 26, 27, 29], Platelia [29], Immulite [23], Serion [23, 31], Dynamiker [23], Genesis [23], Bio-Rad [25, 31], and Bordier [25]. These tests presented different cut-off points, and the one with the best performance is described in S1 Table.

All methodological differences are listed in S1 Table.

Risk assessment of bias

We illustrated the methodological quality of the 14 included studies using the QUADAS-2 tool (Figs 2 and 3). All studies had unclear or high risk of bias in at least one domain. Almost all studies [21–24, 26–34] demonstrated high-risk patient selection bias, except one that was unclear [25]. This resulted mainly from not using consecutive or randomized patient samples and using a case-control study. There was no clear definition of exclusion criteria in seven studies [21, 28, 30–34].

Fig 2. Proportion graph of studies assessed as having low, high or unclear risk of bias and/or applicability concerns

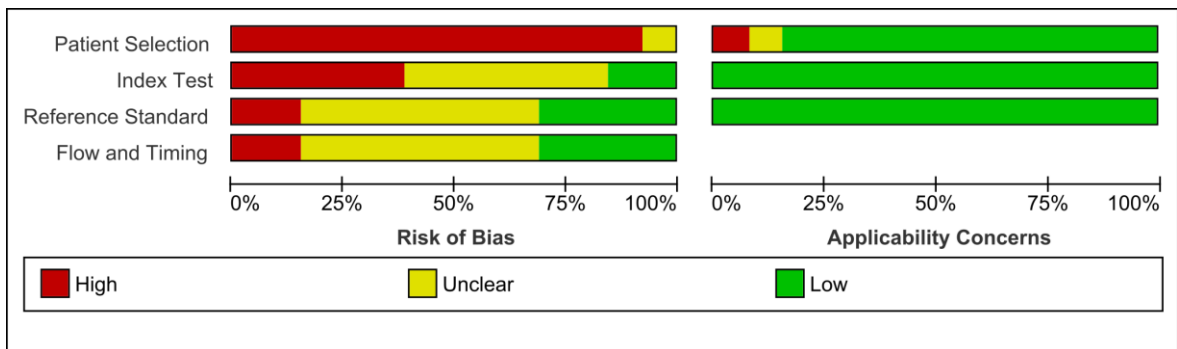


Fig 3. Risk of bias and applicability concerns graph: review of the authors' judgments about each domain presented as percentages across included studies

	<u>Risk of Bias</u>				<u>Applicability Concerns</u>		
	Patient Selection	Index Test	Reference Standard	Flow and Timing	Patient Selection	Index Test	Reference Standard
Azevedo 2015	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Baxter 2013	⊖	⊕	⊕	?	⊕	⊕	⊕
Dumollard 2016	?	?	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕
Faux 1992	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Fujiuchi 2016	⊖	⊖	?	⊖	⊖	⊕	⊕
Guitard 2012	⊖	⊖	⊖	?	⊕	⊕	⊕
Kauffman 1983	⊖	?	?	?	⊕	⊕	⊕
Kurup 1984	⊖	?	?	?	⊕	⊕	⊕
Mishra 1983	⊖	?	?	?	⊕	⊕	⊕
Page 2016	⊖	⊖	?	⊕	⊕	⊕	⊕
Sarfati 2006	⊖	?	?	?	⊕	⊕	⊕
Sehgal 2018	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Yamamoto 1988	⊖	?	?	?	?	⊕	⊕

⊖ **High**
? **Unclear**
⊕ **Low**

In the index test, twelve studies [21–25, 27, 28, 30–34] presented an unclear or high risk of bias. This was mainly because the index test was interpreted with prior knowledge of the standard test. Twelve studies had a low risk of bias in the previous cut-off determination [21–29, 31, 33, 34].

In the reference test, all studies had a low risk of correctly classifying the target condition. Bias risk assessment was uncertain or high risk in ten studies [21, 23–25, 27, 28, 30, 31, 33, 34] owing to a lack of clarity regarding whether the standard test was interpreted without the knowledge of the index test or with prior knowledge.

Regarding flow and time, bias risk assessment was uncertain in nine studies [21, 25, 27–31, 33, 34] for not clearly describing whether there was an appropriate interval between conducting the index test and the reference test. The evaluation was high risk in two studies [24, 27]. All patients were submitted to a reference test in eleven studies, which were included in the analysis [21–24, 26, 29–34]; the results showed low risk. Not all patients were submitted to a test reference in two studies [25, 27], and this was uncertain in one study [28].

Almost all the articles presented low applicability concern, because they did not fail to correspond to the critical question in our study.

Diagnostic accuracy

We present all articles included in this systematic review with a description of the index and reference tests, the number of patients and control groups, and the values of sensibility, specificity, accuracy test, likelihood positive value, likelihood negative value, and Youden's statistic in Table 1.

Table 1. Performance of ELISA test and reference tests in studies included in systematic review

Ref.	Assay	CPA	Healthy controls	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy	LR+	LR-	Youden's J statistic
Azevedo et al., 2015	ELISA in-house ^a	22	200	81.8	94	93	13.64	0.193	0.76
	ELISA In-house ^b	22	200	72.7	97	95	29.09	0.280	0.7
	ELISA in-house ^c	22	200	86.4	96.5	96	24.68	0.141	0.83
	ELISA In-house ^d	22	200	59.1	99.5	96	118.18	0.411	0.59
	DID 1 ^e	22	200	45.5	100	95	183.52	0.545	0.46
	DID 2 ^f	22	200	59.1	100	96	235.96	0.414	0.59
Baxter et al., 2012	ELISA ImmunoCAP	116	-	86	-	-	-	-	-
	ELISA Platellia	116	-	85	-	-	-	-	-
	CIE	116	0	56	-	-	-	-	-
Dumollard et al., 2016	ELISA Bordier	129	0	98	-	-	-	-	-
	ELISA Bio-Rad	129	0	95	-	-	-	-	-
	CIE	129	0	87	-	-	-	-	-
Faux et al., 1992	ELISA In-house	11	18	-	-	-	-	-	-
	DID	11	18	100	100	100	36.42	0.04	1
Fujiuchi et al., 2016	ELISA ImmunoCAP	96 ^g	-	98	-	-	-	-	-
	ELISA ImmunoCAP	51 ^h	-	39	-	-	-	-	-
	DID	147	-	-	-	-	-	-	-
Guitard et al., 2012	ELISA Serion	51	222	92/88 ^t	95.9/91 ^t	95/90 ^t	-	-	0.88/0.79 ^t
	ELISA Bio-Rad	51	222	94/90 ^u	100/99.5 ^t	100/99 ^t	-	-	0.94/0.9 ^t
	CIE	51	222	-	-	-	-	-	-
Kauffman et al., 1983	ELISA In-house	20 (13) ⁱ	50	-	-	-	-	-	-
	DID	20 (13) ⁱ	50	-	-	-	-	-	-
Kurup et al., 1984	ELISA in-house ^j	24	12	83.3	100	88.9	21.32	0.19	0.83

Table 1. Performance of ELISA test and reference tests in studies included in systematic review, Continuation.

Ref.	Assay	CPA	Healthy controls	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy	LR+	LR-	Youden's J statistic
	ELISA in-house ^k	24	12	50	100	66.7	13.00	0.52	0.5
	ELISA in-house ^l	24	12	79.2	100	86.1	20.28	0.23	0.79
	DID 507 ^j	24	12	95.8	91.7	94.4	11.50	0.05	0.88
	DID 534 ^k	24	12	100	83.3	94.4	5.10	0.03	0.83
	DID 515 ^l	24	12	96	100	97.2	24.44	0.06	0.96
Mishra et al., 1983	ELISA In-house	17	50	100	98	98.5	33.06	0.03	0.98
	DID	17	50	100	100	100	99.17	0.03	1
	CIE	17	50	100	100	100	99.17	0.03	1
Page et al., 2016	ELISA ImmunoCAP	341	100	96	98	96	47.95	0.04	0.94
	ELISA Immulite	341	100	96	98	96	47.95	0.04	0.94
	ELISA Serion	341	100	90	98	92	44.87	0.11	0.88
	ELISA Dynamiker	341	100	77	97	82	25.71	0.24	0.74
	ELISA Genesis	341	100	75	99	80	75.07	0.25	0.74
	CIE	341	100	59	100	68	119.01	0.41	0.59
Sarfati et al., 2006	ELISA In-house ^m	51	41	81	98	88	33.09	0.20	0.79
	ELISA In-house ⁿ	51	41	79	98	87	32.37	0.22	0.77
	ELISA In-house ^o	51	41	77	98	86	31.65	0.23	0.75
	ELISA In-house ^p	51	41	93	95	94	19.06	0.07	0.88
	ELISA In-house ^q	51	41	93	95	94	19.06	0.07	0.88
	ELISA in-house ^r	51	41	91	95	93	18.70	0.09	0.86
	ELISA in-house ^s	51	41	95	93	94	12.95	0.06	0.88
	DID	51	41	-	-	-	-	-	-
Sehgal et al., 2018	ELISA ImmunoCAP	137	50	94	100	96	95.72	0.06	0.96
	DID	137	50	26	100	46	26.24	0.75	0.26
Stucky Hunter et al., 2019	ELISA ImmunoCAP	154	-	94	-	-	-	-	-
	ELISA ImmunoCAP	154	-	81	-	-	-	-	-
	DID	108	-	57	-	-	-	-	-
Yamamoto et al., 1988	ELISA in-house	-	45	-	-	-	-	-	-
	DID	-	-	-	-	-	-	-	-

AF (*A.fumigatus*) strain and 0.12 cut-off; b. AF, *A.niger* and *A.flavus* pool and 0.13 cut-off; c. AF strain and 0.09 cut-off; d. AF, *A.niger* and *A.flavus* pool and 0.1 cut-off; e. AF strain; f. AF, *A.niger* and *A.flavus* pool; g. proven cases; h. possible case; i. 20 patients (13 sera); j. AF 507 strain; k. AF 537 strain; l. AF 515 strain; m. RNU; n. DPPV; o. CAT; p. CAT + RNU; q. CAT + DPPV; r. RNU + DPPV; s. RNU + DPPV + CAT; t. first and second percentages were obtained then equivocal results were considered as positives or negatives, respectively.

The Youden index ranged from 0.50 to 0.98 for the ELISA test and from 0.26 to 1 for the reference test (DID and/or CIE) for the individual studies. Four studies presented a good performance above 0.90 Youden index for the ELISA test [23, 26, 31, 34] and three studies for the reference test [21, 32, 34]. Two studies used commercial tests [23, 26] using the fluorescent enzyme immunoassay method with the ImmunoCAP system, and the best cut-off value for this test in our study (sensitivity: 100%, specificity: 96%) was 27 mgA/L [26]. The other studies presented a performance below 0.90. The Youden index indicates the trade-off between sensitivity and specificity.

Quantitative synthesis and meta-analysis

In individual studies included in the meta-analysis, ELISA test sensitivity ranged from 0.83 (95% CI 0.63–0.95) [21] to 0.96 (95% CI 0.93–0.98) [23], and specificity ranged from 0.92 (95% CI 0.64–1.00) [21] to 0.98 (95% CI 0.93–1.00) [23]. The pooled sensitivity and specificity for the ELISA test based on four data studies [21–23, 26] were 0.93 (95% CI 0.87–0.96) and 0.97 (95% CI 0.94–0.98), respectively. Pooled LR+ and LR- were 31.40 (95% CI 16.40–60.10) and 0.07 (95% CI 0.04–0.14), respectively. Pooled DOR was 440.00 (95% CI 156.00–1241.00). We interpreted the pooled LR+/LR- from the ELISA test as conclusive evidence, but we have not interpreted the reference test (DID and/or CIE) in the same way because LR- was included as weak diagnostic evidence.

In the DID and/or CIE test analyses, the sensitivity and specificity in individual studies ranged from 0.26 (95% CI 0.18–0.34) [26] to 0.96 (95% CI 0.79–1.00) [21] and 0.92 (95% CI 0.64–1.00) [21] to 1.00 (95% CI 0.97–1.00) [22], respectively. The pooled sensitivity and specificity for DID and/or CIE tests were 0.64 (95% CI 0.29–0.89) and 0.99 (95% CI 0.96–1.00). Pooled LR+/LR- were 53.00 (95% CI 19.20–146.40) and 0.36 (95% CI 0.14–0.92). Pooled DOR was 146.00 (95% CI 40.00–532.00).

The forest plots in Figs 4 and 5 show the sensitivity, specificity ranges, and heterogeneity for the ELISA test and reference test (DID and/or CIE) in detecting CPA across the included studies.

Fig 4. Forest plot for sensitivity, specificity and heterogeneity from four ELISA studies.

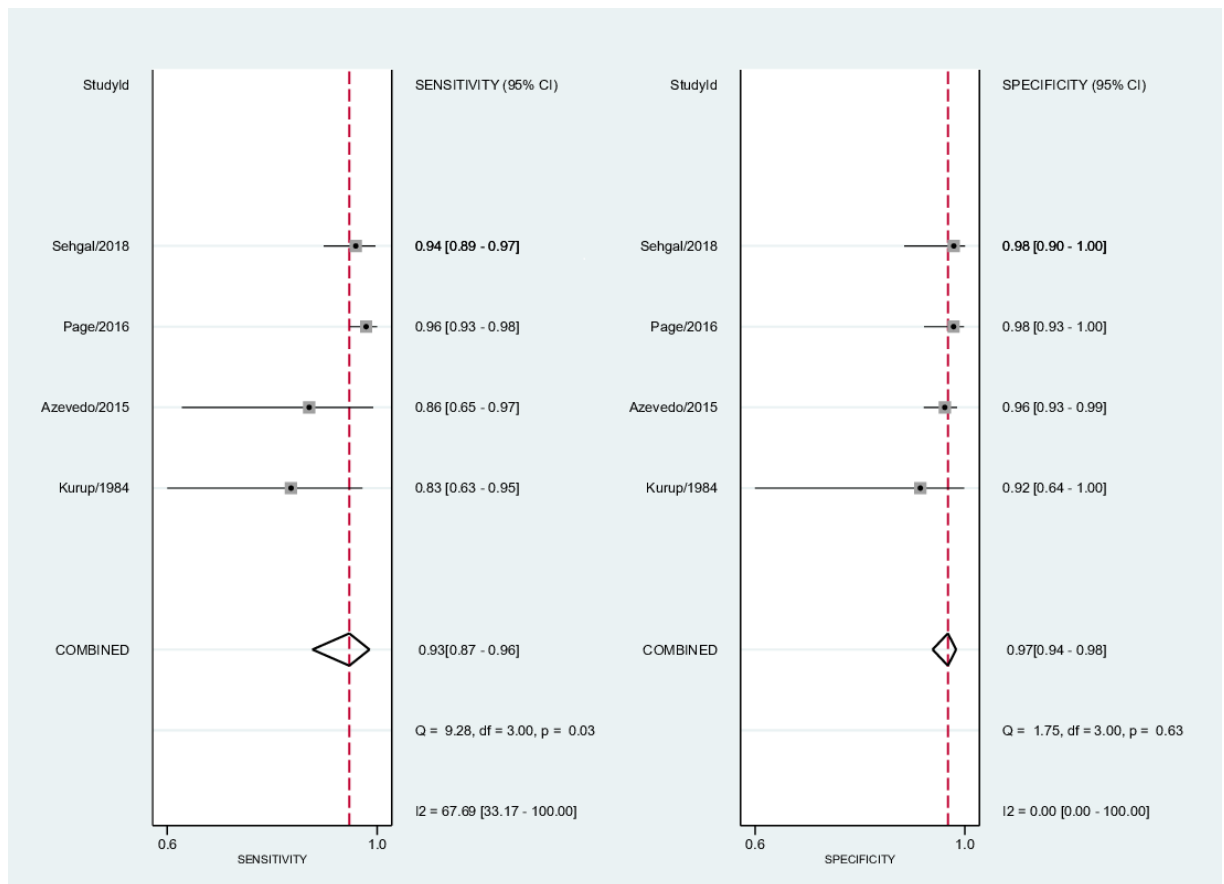
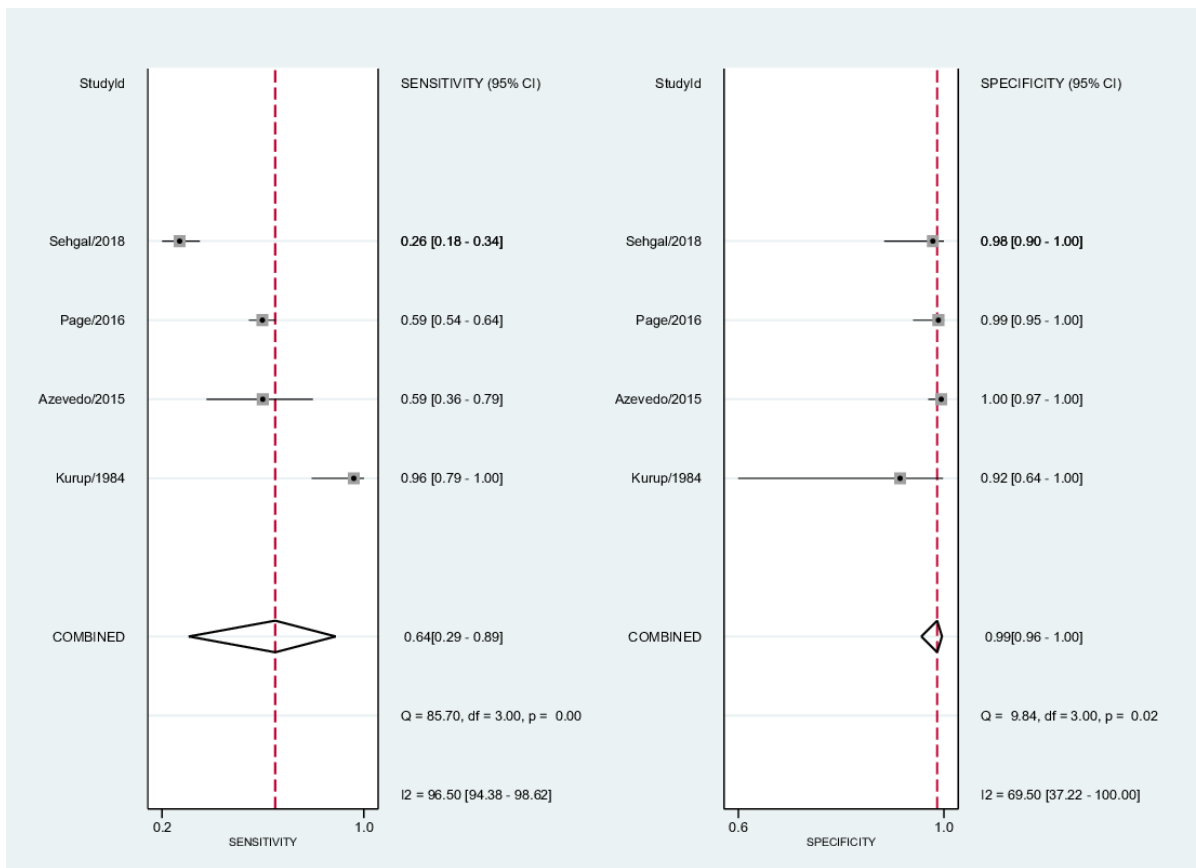
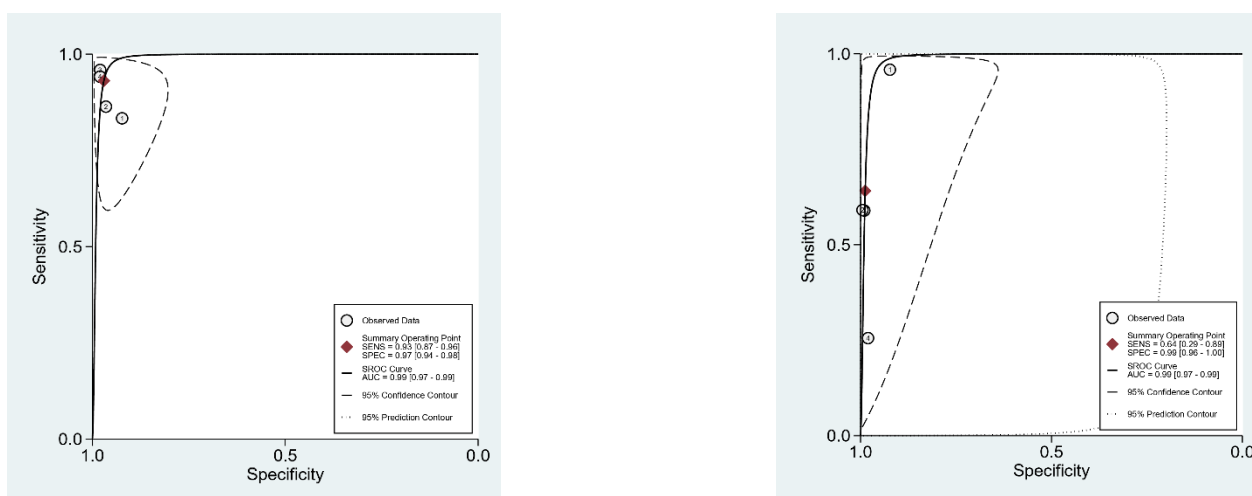


Fig 5. Forest plot for sensitivity, specificity and heterogeneity from four DID and/or CIE studies.



We also constructed the sROC curves and calculated the area under the ROC (AUROC) for included studies (Fig 6). The overall diagnostic performance of ELISA and the reference tests (DID and/or CIE) were comparable (AUROC 0.99 [95% CI 0.97–0.99] and 0.99 [95% CI 0.97–0.99], respectively).

Fig 6. Summary ROC curves from the four included studies. A. AUROC for the ELISA test; B. AUROC for the reference test (DID and/or CIE).



Investigations of heterogeneity

When we evaluated the four studies [21–23, 26], we found a heterogeneity (I²) of 67.69 (95% CI 33.17–100.00) in the ELISA sensitivity pool, considered as moderate heterogeneity, and 96.50 (95% CI 94.38–98.62) in the DID and/or CIE sensitivity pool, considered to be highly heterogeneous. First, we investigated the subgroup analyses, evaluating only the three studies using healthy controls [21–23]. We found a heterogeneity (I²) of 72.40% in the ELISA sensitivity pool and 88.20% in the DID and/or CIE sensitivity pool, considered as high heterogeneity. These results are presented in Figs 7 and 8.

Fig 7. Forest plot of sensitivity (A), specificity (B) and heterogeneity from the ELISA test for the subgroup analyses (three studies with healthy control).

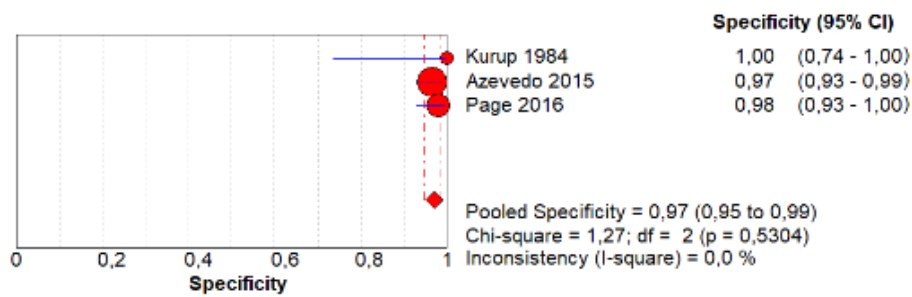
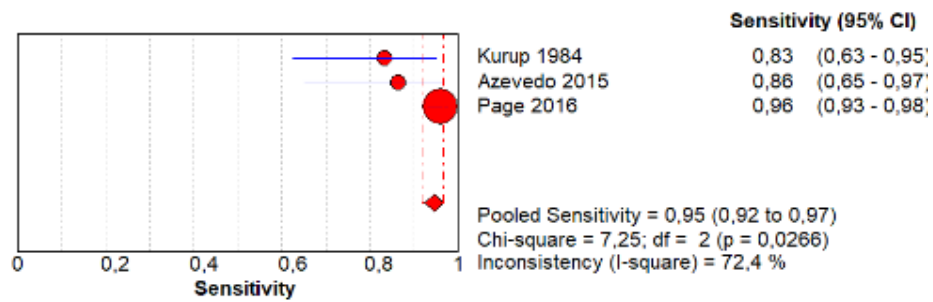
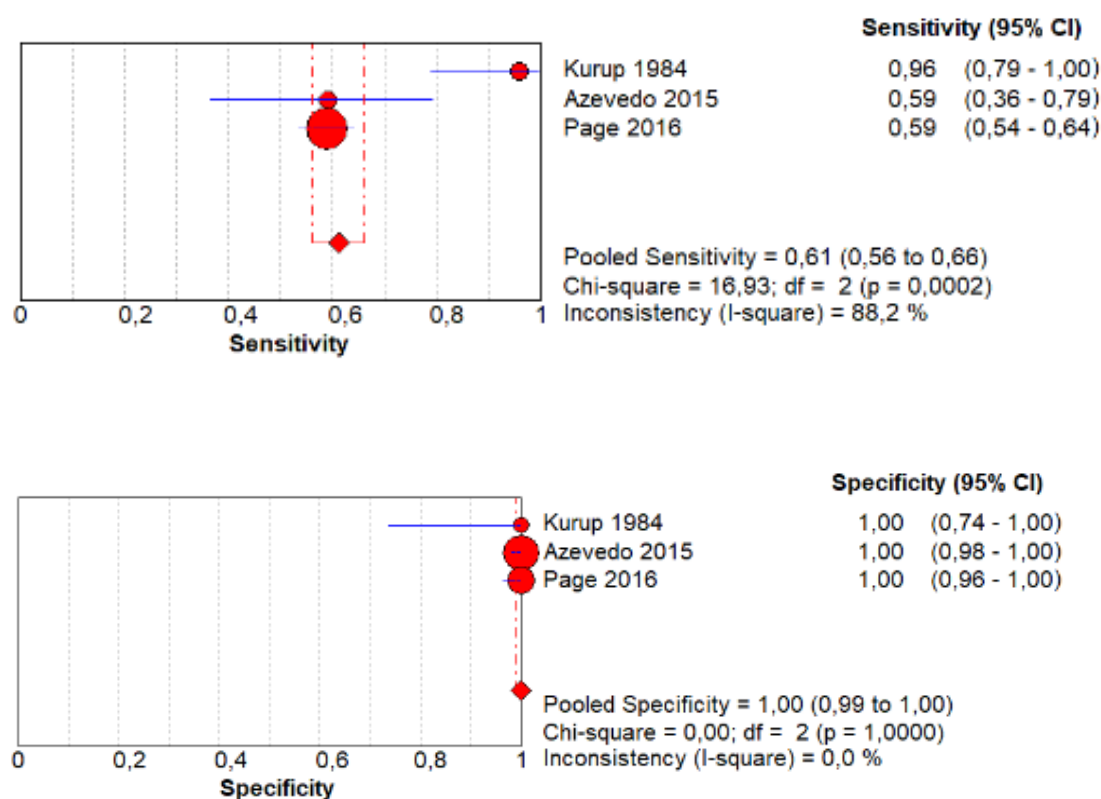


Fig 8. Forest plot of sensitivity (A), specificity (B) and heterogeneity from the DID and/or CIE test for the subgroup analyses (three studies with healthy control).



Next, we investigated the second subgroup analyses, evaluating only the two most recent studies using commercial ELISA tests [23, 26]. The heterogeneity (I²) was 0% for sensitivity and specificity. When we studied the reference tests, the heterogeneity (I²) was 97.8% for sensitivity and 0% for specificity.

The pooled sensitivity and specificity for the ELISA test based on two data studies [23, 26] were 0.95 (95% CI 0.93–0.97) and 0.98 (95% CI 0.95–1.00), respectively. Pooled LR+ and LR- were 54.92 (95% CI 16.08–187.64) and 0.05 (95% CI 0.03–0.07), respectively. Pooled DOR was 1231.40 (95% CI 326.00–4651.70). The pooled sensitivity and specificity for the reference test (DID and/or CIE) based on two data studies [23, 26] were 0.49 (95% CI 0.45–0.54) and 0.99 (95% CI 0.96–1.00), respectively. Pooled LR+ and LR- were 55.39 (95% CI 7.82–392.60) and 0.56 (95% CI 0.29–1.06), respectively. Pooled DOR was 100.07 (95% CI 11.84–845.84). These results are presented in Figs 9 and 10.

Fig 9. Forest plot of sensitivity (A), specificity (B) and heterogeneity from the ELISA test for the subgroup analyses (two studies with commercial tests).

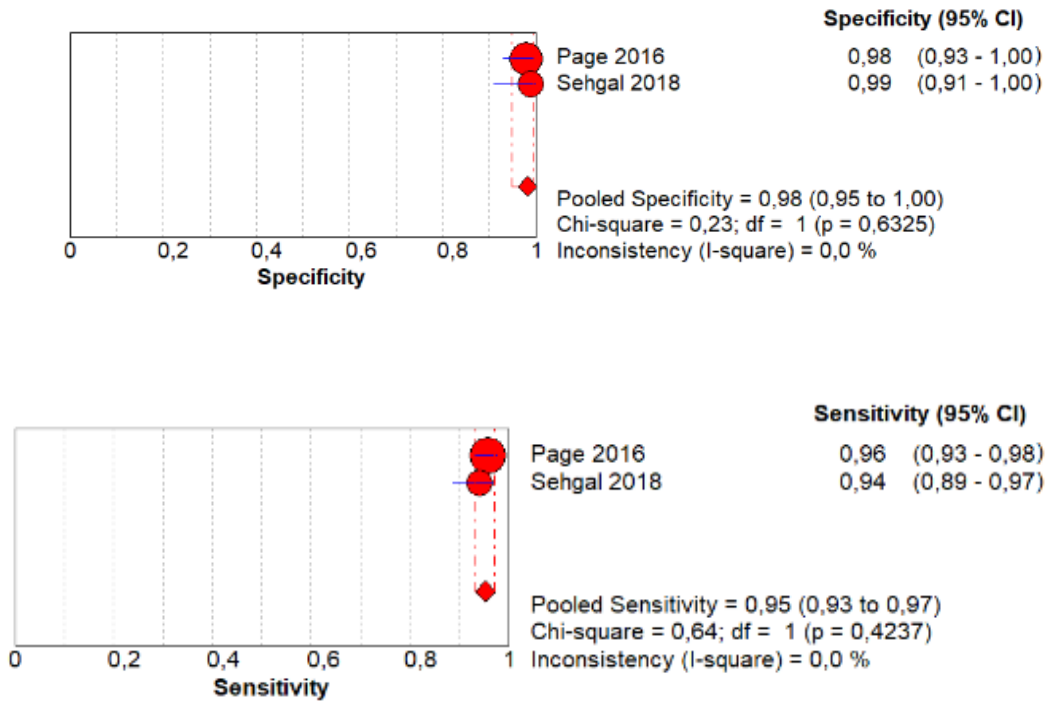
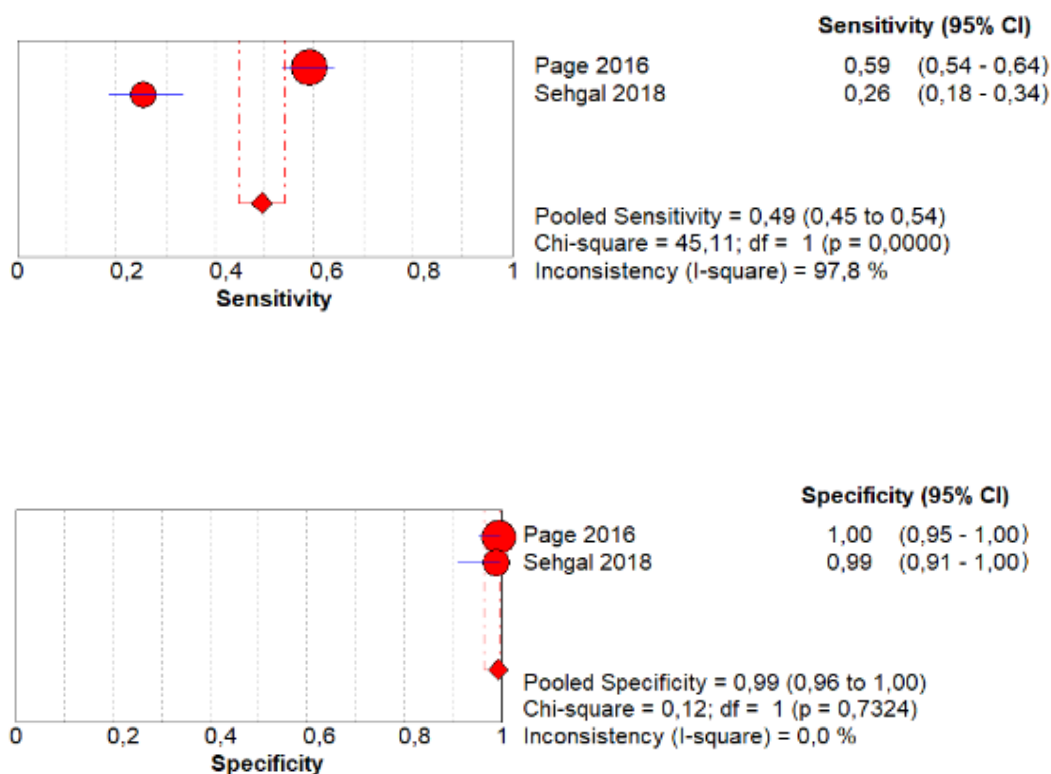


Fig 10. Forest plot of sensitivity (A), specificity (B) and heterogeneity from the DID and/or CIE test for the subgroup analyses (two studies with commercial tests).



Studies using in-house ELISA tests show large methodological differences in their performance. High heterogeneity was maintained for sensitivity in both studies using DID and/or CIE tests [23, 26], considering that the precipitation tests are all in-house and also present large methodological differences in the studies included in this review.

Discussion

To our knowledge, this is the first systematic review to compare ELISA test with precipitin tests (DID and/or CIE) for CPA diagnosis. Although current studies suggest ELISA as a better performing test for CPA diagnosis, precipitation tests are still considered to be the reference test in many countries, especially in Brazil where this review was performed.

Fourteen articles that met the criteria for the research question were included, and all studies were considered to have an uncertain or high risk of bias in some domains in the quality risk assessment.

Important methodological differences were verified, mainly related to the in-house ELISA tests. More recent studies with commercial ELISA tests were included in the review, with the differences described. We also observed this phenomenon in DID and/or CIE tests, because these are all still in-house.

We observed mainly in the former studies that population selection was based on stored samples from patients already diagnosed with CPA and submitted to tests described in the review. In addition, the lack of a checklist in the study descriptions was evident. Many QUADAS-2 items were not clearly reported, interfering with the quality evaluation. As an example, although we were skilled in extracting the data for constructing the 2×2 table, we noted that the discussion and conclusion of one study had an error in printing that was not compatible with the objective, methods, and results of the article [21].

The best performances in the ELISA evaluation of individual studies included in the meta-analysis based on the Youden's test were from the commercial tests [23, 26], ImmunoCAP and Immulite tests, which ranged from 0.94 to 0.96. The best cut-off from the ImmunoCAP system in the individual studies was 27 mgA/L [26].

Our study shows several methods used to identify *A. fumigatus*-specific IgG. For in-house testing, we observed a variety of concentrations and antigens used. For commercial tests, there is also no standard cut-off values. The CPA category could justify different values and the possibility of other etiologies causing fungus ball [35]. Other possibilities for different cut-off values observed in our study may be related to the use of healthy or disease controls and ethnic differences.

When we evaluated Youden's J statistic for the precipitation test (DID or CIE) in the studies included in the meta-analysis, only one study presented a performance of 0.96 [21]. The performance for the other studies [22, 23, 26] ranged between 0.26 and 0.59.

The limitations regarding the use of the precipitin test are based on the requirement for immunodiffusion and electrophoresis migration methods. They do not present antigen standardization, besides requiring additional work and much time to obtain the results, especially in low resource countries [36].

The ELISA test seems to be promising. However, even with important methodological differences, it was useful to evaluate the use of diagnostic data for CPA in each study where it was possible to obtain data for sensitivity and specificity calculation. Two more recent studies were highlighted in this review [23, 26], with sensitivities presenting low confidence intervals for the ELISA test. These studies showed a better performance than the confidence intervals from the reference tests (DID and/or CIE).

Besides that, the pooled LR+/LR- from the ELISA test presented conclusive evidence, and this was not observed in the reference test results.

Several studies have recently been published with serological data using only commercial ELISA tests for CPA diagnosis in an area with high tuberculosis prevalence [1, 12, 37].

The limitations of this study depend on the primary studies. There were problems regarding individual reporting in the primary studies, so we could not construct a 2×2 table. In some cases, the lack of appropriate reporting made us judge the study as having an unclear [21, 28, 30, 33, 34] or high risk of bias [27, 31].

The availability of commercial tests demonstrated in recent studies [23, 26] may facilitate the incorporation of the ELISA test into clinical practice, allowing standardized use for the diagnosis of CPA and replacing the reference test that still depends on in-house performance.

Since the global CPA burden is substantial, mainly as a complication of pulmonary tuberculosis (PTB) [38] and especially in countries such as Brazil, which is among the 30 countries representing over 80% of tuberculosis cases worldwide in 2015 [39], there is still a need for well-designed studies to obtain evidence and demonstrate the use of the ELISA tests compared to precipitation tests.

Although it is not possible to define the evidence strength, the clinical implications of this study were as follows: precipitin detection is laborious, requiring specialized laboratories and presenting low sensitivity for the diagnosis of CPA; in-house ELISA tests do not present standard concentrations and antigens for comparative studies; commercial ELISA tests show better performance for diagnosing CPA, but additional studies must be conducted to identify the best cut-off value; and the ImmunoCAP and Immulite systems demonstrated the best performances among commercial tests.

In conclusion, our meta-analysis suggests that the ELISA test presented better accuracy than the precipitation tests (DID and/or CIE) for CPA diagnosis. Thus, ELISA can be considered as the test of choice in clinical practice.

References

1. Page ID, Byanyima R, Hosmane S, Onyachi N, Opira C, Richardson M, et al. Chronic pulmonary aspergillosis commonly complicates treated pulmonary tuberculosis with residual cavitation. *Eur Resp J*. 2019;53: 1801184.
2. Takazono T, Izumikawa K. Recent advances in diagnosing chronic pulmonary aspergillosis. *Front Microbiol*. 2018;9: 1810.
3. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47: 45-68.
4. Jhun BW, Jeon K, Eom JS, Lee JH, Suh GY, Kwon OJ, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2013;51: 811-817.
5. Kitasato Y, Tao Y, Hoshino T, Tachibana K, Inoshima N, Yoshida M, et al. Comparison of *Aspergillus* galactomannan antigen testing with a new cut-off index and *Aspergillus* precipitating antibody testing for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Respirology*. 2009;14: 701-708.
6. van Toorenenbergen, AW. Between-laboratory quality control of automated analysis of IgG antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;74: 278-281
7. Uffredi ML, Mangiapan G, Cadranel J, Kac G. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22: 457-462.
8. Longbottom JL, Pepys J. Pulmonary aspergillosis: diagnostic and immunological significance of antigens and C-substance in *Aspergillus fumigatus*. *J Pathol Bacteriol*. 1964;88: 141-151.
9. Ward GW, Kohler PF. Counterelectrophoresis as a rapid method for the detection of *Aspergillus* precipitins in pulmonary disease. *Chest*. 1973;63: 49S-51S.
10. Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *Appl Microbiol*. 1972;23: 301-308.
11. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63: e1-e60.
12. Page ID, Richardson MD, Denning DW. Siemens Immulite *Aspergillus*-specific IgG assay for chronic pulmonary aspergillosis diagnosis. *Med Mycol*, 2018;0: 1-8.
13. Barton RC. *Aspergillus* precipitins and serology. In: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Dordrecht: Springer; 2010. pp. 159-69.

14. McInnes MDF, Moher D, Thoms BD, McGrath TA, Bossuyt PM, PRISMA-DTA Group. Preferred reporting items for a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies: The PRISMA-DTA Statement. *JAMA*. 2018;319: 388-396.
15. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Radiology*. 2015;277: 826-832.
16. Deeks J, Bossuyt P, Gatsonis C. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy*. In: 1.0.0 edn: The Cochrane Collaboration; 2013.
17. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011;155: 529-536.
18. Jaeschke R. Users' guides to the medical literature. *JAMA*. 1994;271: 703-707.
19. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3: 32-35.
20. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 2003;327: 557-560.
21. Kurup VP, Resnick A, Scribner GH, Kalbfleisch JH, Fink JN. Comparison of antigens and serological methods in *Aspergillus fumigatus* antibody detection. *Mykosen*. 1984;27: 43-50.
22. Azevedo PZ, Sylvestre TF, Cavalcante RS, Carvalho LR, Moris DV, Oliveira MLCS, et al. Evaluation of the double agar gel immunodiffusion test and of the enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and follow-up of patients with chronic pulmonary aspergillosis. *PLoS One*. 2015;10: 1-16.
23. Page ID, Richardson MD, Denning DW. Comparison of six *Aspergillus*-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). *J Infect*. 2016;72: 240-249.
24. Fujiuchi S, Fujita Y, Suzuki H, Doushita K, Kuroda H, Takahashi M, et al. Evaluation of a quantitative serological assay for diagnosing chronic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54: 1496-1499.
25. Dumollard C, Bailly S, Perriot S, Brenier-Pinchart MP, Saint-Raymond C, Camara B, et al. Prospective evaluation of a new *Aspergillus* IgG enzyme immunoassay kit for diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54: 1236-1242.
26. Sehgal IS, Choudhary H, Dhooria S, Aggarwal AN, Garg M, Chakrabarti A, et al. Diagnostic cut-off of *Aspergillus fumigatus*-specific IgG in the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2018;61: 770-776.

27. Stucky Hunter E, Richardson MD, Denning DW. Evaluation of LDBio *Aspergillus* ICT Lateral Flow Assay for IgG and IgM Antibody Detection in Chronic Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2019;57: e00538-19.
28. Yamamoto S, Toida I, Wada M, Hosojima S, Kudou S. Serological diagnosis of pulmonary aspergillosis by ELISA. *Kekkaku*. 1989;64: 15-24.
29. Baxter CG, Denning DW, Jones AM, Todd A, Moore CB, Richardson MD. Performance of two *Aspergillus* IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19: E197-E204.
30. Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolf E, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;55: 279-291.
31. Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequina C. Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2012;50: 762765.
32. Faux A, Shale DJ, Lane DJ. Precipitins and specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* in a chest unit population. *Thorax*. 1992;47: 48-52.
33. Kauffman HF, Beaumont F, Mews H, Heide S van der, Vries K. Comparison of antibody measurements against *Aspergillus fumigatus* by means of double-diffusion and enzyme-linked immunosorbent assay (ELBA). *J Allergy Clin Immunol*. 1983;72: 255-261.
34. Mishra SK, Falkenberg S, Masihi N. Efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay in serodiagnosis of aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 1983;17: 708-710.
35. Sehgal IS, Dhooria S, Choudhary H, Aggarwal AN, Garg M, Chakrabarti A, et al. Efficiency of *A. fumigatus*-specific IgG and galactomannan testing in the diagnosis of simple aspergilloma. *Mycoses*. 2019;00: 1-8.
36. Denning DW, Page ID, Chakaya J, Jabeen K, Jude CM, Cornet M, et al. Case definition of chronic pulmonary aspergillosis in resource-constrained settings. *Emerg Infect Dis*. 2018;24.
37. Oladele RO, Irurhe NK, Foden P, Akanmu AS, Gbaja-Biamila T, Nwosu A, et al. Chronic pulmonary aspergillosis as a cause of smear-negative TB and/or TB treatment failure in Nigerians. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2017;21: 1056-1061.
38. Denning D, Pleuvry A, Cole D. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ*. 2011;89: 864-872.
39. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.

S1 Table – Characterization of the studies included in this systematic review and meta-analysis.

Reference	Country	Test index and antigens	Reference test and antigens	CPA	Healthy Control	Study Design	Ag/well concentration Elisa	Dilution of the secondary antibody Elisa	Elisa cut-off	Elisa substrate	Ag Concentration on DID and/or CIE	Meta-analysis
Azevedo et al. [22]	Brazil	a. Elisa 1 (AF) b. Elisa 2 (AF pool, <i>A. flavus</i> and <i>A. niger</i>)	a. IDD 1 (AF) b. IDD 2 (pool of AF, <i>A. flavus</i> and <i>A. niger</i>)	22	200	Case-control	10mcg/well	1:3000	a.Elisa 1 - 0.12 (OD), - 0.13 (OD), b. Elisa 2 - 0.09 (OD), - 0.10 (OD)	TMB	Not reported	Yes
Baxter et al. [29]	United Kingdom	a. ImmunoCap (extract of AF conidia and mycelium) b. Platelia (purified, unspecified recombinant antigen – (AF))	CIE (AF somatic; culture filtrate antigens)	116	-	Prospective cohort	Not reported	Not reported	a.>40mg/mL, b. ≥10au/mL	-	AFS - 20mg/mL and culture filtrate antigens - 2mg/mL	No (without specificity date)
Dumollard et al. [25]	France	a.Elisa Bordier – two recombinant antigens with somatic and metabolic antigens from AF b.Platelia® Bio-Rad – one recombinant antigen AF c.Elisa Virion/Serion – antigenic composition not available (AF)	CIE (somatic and metabolic antigen from AF different from those used in the Bordier)	129	-	Prospective cohort	Not reported	Not reported	a.≥1 OD b.≥10au/mL c.>70au/mL	Not reported	10 µL	No (without specificity date)

S1 Table – Characterization of the studies included in this systematic review and meta-analysis. Continuation.

Reference	Country	Test index and antigens	Reference test and antigens	CPA	Healthy Control	Study Design	Ag/well concentration Elisa	Dilution of the secondary antibody Elisa	Elisa cut-off	Elisa substrate	Ag Concentration on DID and/or CIE	Meta-analysis
Faux et al. [32]	Not reported	In-house ELISA (AF)	DID (4 AF extracts)	11	18	Case-control	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	20mg/mL	No (population under 20 and without ELISA date)
Fujiuchi et al. [24]	Japan	ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden) (Gm3 ImmunoCap as an antigen)	DID (<i>Aspergillus</i> immunodiffusion FSK-1 kit (Microgen Bioproducts Ltd., Camberley, United Kingdom) – (AF somatic antigen and culture filtrate).	96 (proven cases) / 51 (possible cases)	-	Case-control	Not reported	Not reported	50mg _A /L	Not reported	Not reported	No (without DID date)
Guitard et al. [31]	France	a. Serion\Virion ELISA Classic AF IgG b. Bio-Rad Platelia® <i>Aspergillus</i> IgG	CIE (somatic and culture filtrate of AF antigens (FKS1; Microgen Bioproducts, United Kingdom)	51	222	Case-control	a. Not reported b. 100 µL	Not reported	a. >70U/mL b. ≥10U/mL	a. not reported b. peroxidase chromogenic substrate	2 µL of a mix (1:1) of somatic and culture filtrate of AF antigens	No (without CIE date; first and second percentages were obtained then erroneous results were considered as positives or negatives, respectively)
Kauffman et al. [33]	Not reported	In-house ELISA (metabolic antigen from AF)	DID (metabolic antigen from AF)	20 sera (13 patients)	50	Case-control	250mcg/well	1:1000	> 31,5% and > 1:200	pNPP	100mg/mL	No (undefined population)

S1 Table – Characterization of the studies included in this systematic review and meta-analysis. Continuation.

Reference	Country	Test index and antigens	Reference test and antigens	CPA	Healthy Control	Study Design	Ag/well concentration Elisa	Dilution of the secondary antibody Elisa	Elisa cut-off	Elisa substrate	Ag Concentration on DID and/or CIE	Meta-analysis
Kurup et al. [21]	Not reported	In-house ELISA (Ag AF 507, Ag AF 534, Ag AF 515)	DID (Ag AF 507, Ag AF 534, Ag AF 515)	24	12	Case-control	4-5mcg/well	1:1000	1:400	TMB	10mg/mL	Yes
Mishra et al. [34]	Not reported	In-house ELISA (Ag AF D142)	a.DID (Ag AF D142) b.CIE (Ag AF D142)	17	50	Case-control	1mcg/well	1:3000	>1:800 and 0.3 absorbance	pNPP	5mg/mL	No (population under 20)
Page et al. [23]	United Kingdom	a.Immulite (not reported) b.ImmunoCAP (Microgen (UK) FSK1 antigens) c.Serion (not reported) d.Dynamiker (purified galactomannan) e.Genesis (not reported)	CIE (Microgen (UK) FSK1 antigens - cytoplasmic and culture filtrate)	341	100	Case-control	Not reported	Not reported	a.10mg/l b.20mg/l c.35U/l d.65AU/mL e.15U/mL	Not reported	20 µL at 2mg/mL	Yes
Sarfati et al. [30]	France	In-house ELISA (recombinant antigens: a.RNU b.DPPV c.CAT d.CAT+RNU e.CAT+DPPV f.RNU+DPPV g.CAT+RNU+DPPV)	DID (somatic and metabolic <i>Aspergillus</i> antigens)	51	41	Case-control	a.0.1mcg/well, b.0.1mcg/well, c.0.4mcg/well, d.0.5mcg/well, e.0.5mcg/well, h.0.2mcg/well g.0.6mcg/well	Not reported	Not reported	OPD	Not reported	No (without DID date)
Sehgal et al. [26]	India	ImmunoCAP (extract derived from the conidia and mycelia of AF)	DID (extracts of AF)	137	50	Case-control	Not reported	Not reported	27mgA/L	Not reported	Not reported	Yes

S1 Table – Characterization of the studies included in this systematic review and meta-analysis. Continuation.

Reference	Country	Test index and antigens	Reference test and antigens	CPA	Healthy Control	Study Design	Ag/well concentration Elisa	Dilution of the secondary antibody Elisa	Elisa cut-off	Elisa substrate	Ag Concentration on DID and/or CIE	Meta-analysis
Stucky Hunter et al. [27]	United Kingdom	ImmunoCAP (Phadia 153 1000 System - Thermo Scientific, Waltham, MA)	DID ((Microgen Bioproducts, Surrey, UK)	154 (ImmunoCAP) 108 (DID)	-	Case-control	Not reported	Not reported	20mgA/L 40mgA/L 50mgA/L	Not reported	Not reported	No (without specificity date and the two tests were not performed on all CPA patients).
Yamamoto et al. [28]	Japan	In-house ELISA (AF)	DID (not reported)	Undefined	45	Case-control	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	No (undefined population)

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; AF: *Aspergillus fumigatus*; Ag: antigen; DID: double immunodiffusion; CPA: chronic pulmonary aspergillosis; OD: optical density; CIE: counterimmunoelectrophoresis; TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; pNPP: alkaline phosphatase yellow; OPD: o-phenylenediamine; RNU: 18 kDa ribonuclease; DPPV: 88 kDa dipeptidylpeptidase; CAT: 360 kDa catalase

Artigo 2 – (Manuscrito a ser submetido para publicação)

PREVALÊNCIA DE ASPERGILOSE PULMONAR CRÔNICA E ACURÁCIA DE TESTES
SOROLÓGICOS EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR NA REGIÃO
CENTRO-OESTE DO BRASIL

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.

5.2 Prevalência de aspergilose pulmonar crônica e acurácia de testes sorológicos em pacientes com tuberculose pulmonar na região Centro-Oeste do Brasil.

Resumo

A prevalência de aspergilose pulmonar crônica (APC) em indivíduos com tuberculose curada ou em atividade é pouco conhecida, principalmente pela dificuldade em se estabelecer seu diagnóstico. O diagnóstico de APC é baseado em sintomas pulmonares e tomografia de tórax, e é considerado confirmado quando, além desses, há evidências microbiológicas ou sorológicas de infecção por *Aspergillus* spp. Para estimar a prevalência de APC e a acurácia de dois testes sorológicos, 193 pacientes consecutivos, em tratamento ou previamente tratados de tuberculose pulmonar (TBP), foram submetidos à: 1) avaliação clínica; 2) tomografia de tórax; 3) micológico direto e cultura de fungos em escarro; e, 4) pesquisa de anticorpos anti-*Aspergillus fumigatus* pelo teste ELISA Platellia® e anti- *Aspergillus* spp por imunodifusão dupla (IDD). Os casos de APC confirmados por ELISA e IDD foram excluídos das análises de acurácia de ELISA e de IDD, respectivamente. Um grupo controle, com 100 doadores de sangue saudáveis foi incluído para as análises de acurácia. Prevalência global de APC foi de 10,9% (IC 95%: 7,2% – 16,1%). As variáveis independentemente associadas à APC foram ter tido TBP há mais de quatro anos e apresentar hemoptise. Cavidades, espessamento pleural e presença de bola fúngica foram as alterações tomográficas mais frequentes em pacientes com APC. A especificidade da IDD e ELISA foi 100% e 99% respectivamente. Para os casos confirmados de APC, a sensibilidade de IDD foi de 35,7% e ELISA foi de 88,9%. Ao considerarmos a acurácia dos testes de casos confirmados e prováveis, a sensibilidade de IDD foi de 29,4% e ELISA foi 76,5%. A frequência de óbitos entre os pacientes com APC foi de 28,6%. Considerando o grande número de pessoas afetadas por TB em países de alta carga da doença, como o Brasil, a prevalência aqui observada indica a necessidade de vigilância contínua de APC em pacientes com TBP desde o tratamento e ao longo da vida, não apenas com exames sorológicos, mas com avaliação clínica e tomográfica, para um diagnóstico oportuno e melhor prognóstico.

Introdução

Aspergilose pulmonar crônica (APC) é uma das diferentes formas clínicas da aspergilose, de grave evolução, considerada negligenciada [1]. Acomete indivíduos imunocompetentes ou com leve imunossupressão [1-3] e, geralmente aqueles com cavidade preexistente por doença pulmonar crônica, sendo a tuberculose seu principal fator predisponente [3].

A tuberculose (TB) afeta cerca de 10 milhões de pessoas a cada ano e é uma das 10 principais causas de morte no mundo e a principal causa quando há um agente infeccioso identificado principalmente em pacientes HIV/AIDS [4].

Cavidade residual após tratamento de tuberculose pulmonar (TBP) é identificada em 20 a 30% dos pacientes curados [5]. Aplicando-se as taxas anuais de novos casos de APC, estima-se que 112.000 a 160.000 pessoas poderão desenvolver a doença a cada ano após a terapia para TBP em todo o mundo, com letalidade de 38 a 85% em 5 anos, a depender da forma clínica de apresentação [3, 6-8].

Poucos estudos sobre a prevalência de APC na TB têm sido desenvolvidos, e mostram taxas entre 8,3 e 25% [3]. Essa variação ocorre, entre outras causas, devido à dificuldade em se estabelecer o diagnóstico de APC.

O diagnóstico de APC é baseado em sintomas pulmonares e tomografia de tórax, e é considerado confirmado quando além desses, há evidências microbiológicas ou sorológicas de infecção por *Aspergillus* spp [9]

Os testes sorológicos ganharam destaque no diagnóstico de APC por não serem invasivos para o paciente e por indicarem infecção, diferenciando da colonização [10, 11]. Nosso grupo publicou recentemente uma revisão sistemática sobre acurácia do teste imunoenzimático (ELISA) comparada com testes de precipitação; na avaliação de estudos incluídos na metanálise os testes ELISA comerciais demonstraram maior sensibilidade do que os testes de precipitação [12].

Tendo em vista o que se expôs, conduziu-se um estudo para estimar a prevalência de APC em pacientes previamente tratados ou em tratamento de TBP, bem como para avaliar a acurácia de testes sorológicos ELISA e de precipitação em gel de ágar, em pacientes atendidos em um ambulatório de referência de hospital de alta complexidade para tratamento de tuberculose em hospital de referência para pacientes críticos em Mato Grosso do Sul, Brasil.

Pacientes e métodos

Local e período do estudo

Foi conduzido um estudo transversal analítico em pacientes com tuberculose pulmonar (TBP) atendidos consecutivamente no ambulatório do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) com 230 leitos, ou admitidos no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS), com 352 leitos, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, no período entre fevereiro de 2016 e novembro de 2019.

Participantes do estudo

Foram incluídos no estudo pacientes com 18 anos ou mais, já tratados ou estarem com TBP em atividade. Foram excluídos pacientes com outras doenças infecciosas, inflamatórias ou neoplásicas, gestantes e lactantes.

Cálculo amostral

O cálculo da amostra foi feito para um estudo de prevalência, admitindo-se um erro tipo α igual a 5% (0,05), considerando-se a prevalência estimada de bola fúngica de 14% com base em estudo prévio [13] e o número de casos de tuberculose notificados no Estado de Mato Grosso do Sul em 2017 (n=813) [14]. Assim, determinou-se que 151 era o menor número de pacientes a serem incluídos no presente estudo.

Definições

A TBP foi considerada confirmada quando o paciente apresentava manifestações clínicas compatíveis e identificação de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) ou cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e/ou teste rápido molecular positivo em escarro, aspirado traqueal ou lavado broncoalveolar.

A TBP foi considerada provável quando o paciente apresentava manifestações clínicas e imagem radiológica de tórax compatíveis com tuberculose, mas sem identificação do agente e que tenha respondido à terapêutica específica.

Os pacientes com doença pulmonar crônica relacionada a *Aspergillus* spp. foram distribuídos em cinco síndromes distintas, com as definições de caso apresentadas abaixo [15]:

1. Aspergiloma simples (AS): presença de cavidade pulmonar simples contendo uma bola fúngica com evidência microbiológica ou sorológica da presença de *Aspergillus* spp. em um paciente não-imunossuprimido com poucos ou nenhum sintoma e nenhuma progressão radiológica em três meses de observação.
2. Aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC): presença de uma ou mais cavidades pulmonares (com parede fina ou grossa) possivelmente contendo um ou mais aspergilomas ou material intraluminal irregular, com evidência microbiológica ou sorológica de *Aspergillus* spp. com sintomas pulmonares significantes ou sistêmicos e evidente progressão radiológica (novas cavidades, aumento de infiltrados pericavitários ou progressão de fibrose) durante pelo menos três meses de observação.
3. Aspergilose pulmonar fibrosante crônica (APFC): presença de destruição por fibrose grave de pelo menos dois lobos do pulmão complicando APCC levando a uma perda maior da função pulmonar.
4. Nódulo de *Aspergillus*: presença de um ou mais nódulos que podem ou não cavitarem. Necessita avaliação histológica.
5. Aspergilose pulmonar invasiva subaguda (APSI): envolve geralmente pacientes imunocomprometidos, ocorrendo ao longo de 1-3 meses, com achados radiológicos incluindo cavitação, nódulos, consolidação progressiva com formação de abscessos. Para sua confirmação, exame histopatológico pode demonstrar hifas invadindo o pulmão e a investigação microbiológica é semelhante à aspergilose invasiva.

APC foi considerada provável se o paciente apresentava critérios clínicos e tomográficos e nenhuma evidência microbiológica ou sorológica fosse identificada.

Procedimentos do estudo

Os pacientes foram submetidos aos seguintes procedimentos:

Avaliação clínica: Foram coletadas informações sobre características sociodemográficas, clínicas obtidas por entrevista com o paciente a cada consulta clínica por um período de três meses. Foi utilizado um formulário padronizado para a coleta de dados.

Exames microbiológicos: Foram coletadas amostras de escarro, aspirado traqueal ou lavado broncoalveolar em frascos estéreis e encaminhados ao laboratório de micologia do HUMAP à temperatura ambiente em até 2 horas ou mantidas em refrigeração (2 a 8°C) em até 24 horas. Foram realizados os exames de pesquisa microscópica direta para fungos em montagem com hidróxido de potássio (KOH) a 20% e cultura para fungos em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (em tubos e placas incubados a 30°C). No exame direto buscou-se a presença de hifas hialinas septadas com diâmetro entre 3 e 6 µm, parede lisa e espessa, com ramificação dicotômica em ângulo de 45°, acompanhadas ou não de clamidoconídeos. Também foram considerados fragmentos de hifas hialinas septadas. A identificação de *Aspergillus* spp. dos isolados foi realizada segundo a técnica de microcultivo em ágar batata [16, 17].

Exames sorológicos: Amostras de sangue de 157 pacientes foram coletadas e os soros foram estocados a -80°C e processados no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da UFMS (LabDIP). As amostras foram descongeladas uma única vez e submetidas ao mesmo tempo, a um teste imunoenzimático (ELISA) e a um teste de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), para detecção de anticorpos específicos contra *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*). O teste imunoenzimático foi realizado por ELISA Platelia® Bio-Rad, considerando-se positivo um teste >10UI/mL, intermediário entre 5-10UI/ml e negativo <5UI/ml. A reação de IDD foi feita segundo a técnica de *Ouchterlony*, utilizando como antígeno, *A. fumigatus* [18, 19] considerando-se positiva a partir de uma linha de precipitação.

Tomografia computadorizada de tórax: A TC de tórax de alta resolução foi feita em tomógrafo da Marca TOSHIBA - Modelo Aquillion 64 slices, no HUMAP e em tomógrafo da Marca SIEMENS Modelo SOMATON EMOTION no HRMS. Os exames foram avaliados

independentemente por dois pesquisadores, um infectologista (CEVC) e um radiologista (TFN), os casos discordantes foram resolvidos por consenso. Os achados tomográficos foram caracterizados segundo as especificações da Fleischer Society [20].

Análise estatística

Variáveis categóricas foram comparadas pelo teste qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher. Variáveis numéricas foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram realizadas utilizando-se o programa EPI Info 7. Os efeitos de confusão foram minimizados realizando o ajuste de regressão logística binária para potenciais fatores de confusão identificados na análise. Esses potenciais confundidores são variáveis que apresentaram $p \leq 0,20$. As análises estatísticas foram realizadas no SAS - Statistical Analysis System versão 6.12, SAS Institute Inc., EUA.

Foram calculados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) dos testes ELISA e IDD no diagnóstico de APC [21]. O coeficiente de concordância kappa e o Índice de Youden também foram calculados. A concordância em função do coeficiente kappa foi interpretada da seguinte forma: (a) ruim: quando abaixo de 0,00; b) leve: entre 0,00 a 0,20; c) razoável: entre 0,21 e 0,40; d) moderada: entre 0,41 e 0,60; e) substancial: entre 0,61 e 0,80; f) quase perfeita: entre 0,81 e 0,99; e, g) perfeita quando igual a 1,00 [22]. O Índice de Youden varia de 0 a 1, com a expectativa de que o teste possa demonstrar uma maior proporção de resultados positivos para o grupo doente do que para o grupo controle [23].

Para as análises dos parâmetros de acurácia da IDD, foram utilizados dois padrões de referências:

Referência 1 – Casos de APC confirmados com microbiologia ou ELISA;

Referência 2 – Casos de APC prováveis ou confirmados com microbiologia ou ELISA;

Para as análises dos parâmetros de acurácia do ELISA, foram utilizados os dois seguintes padrões de referência:

Referência 3 – Casos de APC confirmados com microbiologia ou IDD;

Referência 4 – Casos de APC prováveis ou confirmados com microbiologia ou IDD.

O grupo controle saudáveis foi constituído de 100 indivíduos, doadores de sangue, cuja distribuição segundo idade e sexo era semelhante a dos pacientes do estudo.

Para avaliação de reações cruzadas do teste ELISA, foram usados os soros dos participantes com TBP em atividade e sem APC (n=119) e soros estocados de participantes com PCM em atividade e sem APC (n=20).

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (processo número 1.840.731). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Resultados

Foram incluídos no estudo 193 pacientes, 78,8% dos quais eram do sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 18 a 87 anos, com mediana igual a 51 anos, e 64 (33,2%) deles relatavam TBP prévia à inclusão no estudo. A grande maioria, 155 pacientes (80,3%), apresentava TBP em atividade no momento da inclusão. A taxa de prevalência de APC foi de 10,9% (IC 95%: 7,2% – 16,1%). Considerando apenas os casos confirmados por exame microbiológico ou sorológico, a prevalência foi de 7,8% (IC 95%: 4,6% – 12,7%) (tabela 1).

Na análise univariada, observa-se que pacientes com APC tinham maior frequência de TBP prévia e de DPOC que os sem APC. Quanto aos sintomas, observou-se maior frequência de hemoptise e menor de sudorese que os sem APC. A frequência de óbito em pacientes com APC no estudo, foi de 28,6%. A ocorrência de óbitos por hemoptise foi maior em pacientes com APC (tabela 2). Após análise multivariada, observou-se que apenas TBP prévia há quatro anos ou mais e hemoptise estavam independentemente associadas à APC, com *odds ratio* de 17,54 (1,85-166,67) e 9,61 (2,21-41,67), respectivamente (tabela 3).

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e aspectos relacionados à tuberculose pulmonar (TBP) como doença de base dos 193 indivíduos incluídos no estudo.

Variáveis	Nº (%) ou mediana [IQR]
Sexo masculino	152 (78,8)
Idade (em anos)	51,0 [37,0-64,0]
Residente em Campo Grande – MS	163 (84,4)
TBP 1ª episódio	129 (66,8)
História de TBP prévia	64 (33,2)
Tempo desde a TBP prévia (em anos)	4,0 [2,0-14,5]
TBP em atividade*	155 (80,3)
Confirmada	110 (57,0)
Provável	45/193 (23,3)
TBP em atividade	
Exclusiva	70 (36,3)
Associada à extrapulmonar	85/193 (44,0)
Local do atendimento	
Hospitalizados	99 (51,3)
Ambulatoriais	94 (48,7)
APC	21 (10,9)
APC confirmada	15 (7,8)
APC provável	6 (3,1)
Óbito	6 (28,6)

IQR: intervalo interquartil; MS: Mato Grosso do Sul; APC: Aspergilose pulmonar crônica; TB: tuberculose; TBP: tuberculose pulmonar. *26 pacientes tinham tido TB prévia e estavam com TB em atividade.

Tabela 2. Variáveis epidemiológicas e clínicas de 193 pacientes com tuberculose pulmonar (TBP) prévia ou atual, quanto à presença de aspergilose pulmonar crônica (APC).

Variáveis	Com APC (Nº=21) n (%)	Sem APC (Nº=172) n (%)	Valor-p
Sexo masculino	18 (85,7)	134 (88,2)	0,587
Idade ≥ 50 anos	13 (61,9)	87 (50,6)	0,453
Cor			
Branca	9 (45,0)	41 (25,5)	0,115
Não branca	11 (55,0)	120 (74,5)	
Anos de estudo			
≤9	12 (75,0)	90 (68,2)	0,786
> 9	4 (25,0)	42 (31,8)	
Tabagismo	14 (66,7)	89 (53,0)	0,339
Alcoolismo	7 (33,3)	84 (50,0)	0,226
Uso de drogas	3 (14,3)	55 (32,7)	0,139
Residentes em Campo Grande – MS	17 (81,0)	146 (84,9)	0,880
TBP prévia	19 (90,5)	45 (26,2)	<0,001
TBP prévia há 4 anos ou mais	14 (66,7)	21 (12,2)	<0,001
TBP em atividade	8 (38,1)	147 (85,5)	<0,001
Sinais e sintomas			
Febre	14 (66,7)	117 (68,8)	1,000
Febre vespertina	7 (35,0)	82 (48,5)	0,363
Tosse	17 (85,0)	134 (79,3)	0,758
Tosse produtiva	12 (60,0)	89 (52,7)	0,700
Hemoptise	12 (60,0)	41 (24,3)	0,001
Sudorese noturna	3 (15,0)	82 (49,1)	0,007
Fraqueza	14 (66,7)	117 (68,8)	1,000
Perda de > 10% do peso	12 (57,1)	101 (60,5)	0,953
Comorbidades	11 (52,4)	57 (33,1)	0,133
DM	5 (23,8)	23 (13,4)	0,340
HAS	5 (23,8)	29 (16,9)	0,627
DPOC	6 (28,6)	7 (4,1)	<0,001
Asma brônquica	1 (4,8)	6 (3,5)	1,000
Pacientes hospitalizados	12 (57,1)	87 (50,6)	0,736
Dias de hospitalização	12 [6-22]	15 [6-22]	0,976
Óbito	6 (28,6)	28 (16,3)	0,220
Por insuficiência respiratória	3 (14,3)	25 (14,5)	1,000
Por hemoptise	2 (9,5)	1 (0,6)	0,032
Por choque séptico	2 (9,5)	23 (13,4)	1,000

TBP: tuberculose pulmonar; DM: diabetes mellitus; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; MS: Mato Grosso do Sul; APC: aspergilose pulmonar crônica.

Tabela 3. Resultado das análises de regressão logística univariada e multivariada, incluindo as variáveis da tabela 1 que apresentaram valor de $p \leq 0,20$, de acordo com a presença de aspergilose pulmonar crônica.

Variáveis	Com APC		Sem APC		OR não ajustada (IC 95%)		OR ajustada (IC 95%)	
	(N°=21) n (%)	(N°=172) n (%)						
Cor branca	9 (45,0)	41 (25,5)			2,39 (0,93 - 6,12)		1,47(0,39-5,55)	
Uso de drogas	3 (14,3)	55 (32,7)			0,34 (0,10 - 1,21)		2,11(0,34-13,28)	
TBP prévia	19 (90,5)	45 (26,2)			26,81 (6,01 - 119,70)		2,88(0,57-14,49)	
TBP prévia há 4 anos ou mais	14 (66,7)	21 (12,2)			14,38 (5,21-39,71)		17,54(1,85-166,67)	
TBP em atividade	8 (38,1)	147 (85,5)			0,11 (0,04- 0,28)		1,29(0,26-6,33)	
Hemoptise	12 (60,0)	41 (24,3)			4,68 (1,79- 12,25)		9,61(2,21-41,67)	
Sudorese noturna	3 (15,0)	82 (49,1)			0,18 (0,05 - 0,65)		0,21(0,04-1,12)	
Comorbidades	11 (52,4)	57 (33,1)			2,22 (0,89- 5,53)		1,81(0,45-7,19)	
DPOC	6 (28,6)	7 (4,1)			9,43 (2,81 - 31,68)		3,89(0,54-27,78)	
Óbito por hemoptise	2 (9,5)	1 (0,6)			18,00 (1,56 - 207,93)		1,64(0,07-38,46)	

APC: aspergilose pulmonar crônica; OR: odds ratio; TBP: tuberculose pulmonar; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica.

Avaliação micológica. Dos 21 pacientes com APC pelos critérios utilizados no estudo, foi possível detectar hifas hialinas septadas no exame micológico direto ou isolar *Aspergillus* spp em cultivo de amostras respiratórias de 5 (23,8) e 4 (19,1%) deles, respectivamente. Entre os 172 pacientes que não preencheram critério diagnóstico de APC, dois (1,59%) e 14 (11,1%) apresentaram exame micológico direto e cultura positiva, respectivamente (tabela 4).

Tabela 4. Exames diagnósticos de 193 pacientes com tuberculose pulmonar (TBP) prévia ou atual, com e sem aspergilose pulmonar crônica (APC).

Variáveis	Com APC (Nº=21) n (%) ou med [IQR]	Sem APC (Nº=172) n (%) ou med [IQR]	Valor-p
MD positivo*	5 (23,8)	2 (1,6)	<0,001
Cultura positiva	4 (19,1)	14 (11,1)	0,504
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3 (14,3)	2 (1,2)	0,005
<i>Aspergillus niger</i>	0 (0)	6 (3,6)	0,823
<i>Aspergillus spp</i>	1 (5,0)	3 (1,8)	0,902
ELISA Platellia® (Bio-Rad)			
Positiva (>10UI/ml)	13/17 (77,0)	0/140 (0)	<0,001**
Indeterminada (5-10UI/ml)	1/17 (6,0)	0/140 (0)	
Negativa (<5UI/ml)	3/17 (18,0)	140/140 (100,0)	
IDD			
Positiva	5/17 (29,4)	0/140 (0)	<0,001
Negativa	12/17 (70,6)	140/140 (100,0)	

MD: micológico direto* micológico direto revelando hifas hialinas septadas. **O valor indeterminado foi considerado negativo para o cálculo de acurácia.

Os achados tomográficos mais frequentes nos pacientes com APC foram cavidade (100.0%), espessamento pleural (90.5%) e bola fúngica (90.5%), como revela a tabela 5. A comparação de grupos de pacientes com e sem APC revelou maior prevalência de cavitação, presença de apenas uma cavidade, cavidade em LSD, bola fúngica e espessamento pleural entre os primeiros (tabela 5).

Tabela 5. Achados na tomografia de tórax de 193 pacientes com tuberculose pulmonar (TBP) prévia ou atual, quanto à presença ou não de aspergilose pulmonar crônica (APC).

Variáveis	Pacientes com APC (%) nº=21	Pacientes sem APC (%) nº=172	Valor-p
Cavidade	21 (100,0)	73 (45,3)	<0,001
Única	10 (47,6)	19 (11,8)	<0,001
Múltiplas	10 (50,0)	54 (33,5)	0,228
Bilateral	5 (25,0)	31 (19,3)	0,756
Lobo S. D	14 (66,7)	56 (34,8)	0,009
Lobo S. E.	11 (55,0)	54 (33,5)	0,101
Bola fúngica	19 (90,5)	-	<0,001
Consolidação	2 (10,0)	39 (24,22)	0,250
Espessamento pleural	19 (95,0)	36 (22,4)	<0,001
Nódulos	7 (35,0)	69 (42,9)	0,666

TBP: tuberculose pulmonary; APC: aspergilose pulmonar crônica; S.D: superior direito; S.E: superior esquerdo.

De acordo com a apresentação clínica de APC, 20 (95,2%) pacientes foram classificados como APCC e 1 (4,7%) como APFC. As características demográficas, clínicas, diagnósticas e tomográficas de cada um dos 21 pacientes com APC são mostradas na tabela S1.

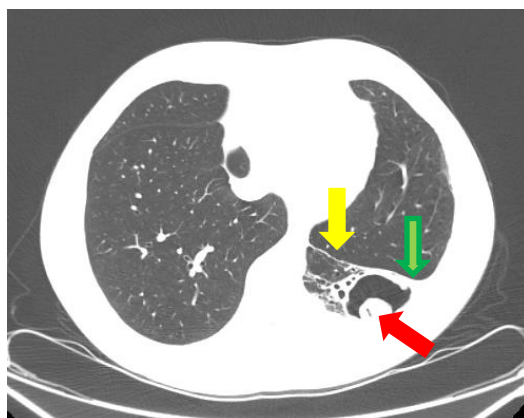


Figura 1. Tomografia de tórax do paciente nº 13 (Tabela S1), evidenciando cavidade em lobo esquerdo com espessamento pleural (seta verde), estrias fibróticas (seta amarela) e presença de bola fúngica (seta vermelha).

Quadro S1 – Características clínicas, laboratoriais e tomográficas de 21 pacientes com aspergilose pulmonar crônica (APC).

Caso	Sexo; Idade	Classificação de APC	Tempo do primeiro diagnóstico de TB (anos)	TBP atual no diagnóstico de APC (método diagnóstico laboratorial)	Micológico direto	Cultura (espécie)	DID	ELISA (UI/mL)	Doença de base	Sintomatologia	Achados tomográficos	Última observação clínica
1	M; 64	APCC	20	Não	Pos	Neg	Neg	Pos (>80,00)	Asma brônquica	Febre, tosse, expectoração, hemoptise, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidades múltiplas em lobo esquerdo, espessamento pleural, presença de bola fúngica.	Satisfatória
2	M; 39	APCC	5	Sim (BAAR pos)	Neg	Pos (AF)	Pos	Pos (>80,00)	Não	Febre, tosse, expectoração, hemoptise, astenia e sudorese noturna.	Cavidades múltiplas em lobo direito, espessamento pleural, presença de bola fúngica.	Óbito
3	F; 34	CFPA	15	Não	Neg	Neg	Neg	Pos (11,92)	Não	Febre, tosse, expectoração, hemoptise, sudorese noturna e perda de peso >10%.	Cavidades múltiplas em lobo direito e esquerdo, espessamento pleural, nódulos, presença de bola fúngica, consolidação, destruição por fibrose em ambos os pulmões.	Evolução com pneumonia de repetição.
4	M; 53	APCC	2	Sim (Gene xpert e cultura positivos)	Neg	Pos; (AF)	-	-	DM	Febre, tosse, expectoração, astenia.	Cavidade simples em lobo direito, espessamento pleural e presença de bola fúngica.	Satisfatória

Quadro S1 – Características clínicas, laboratoriais e tomográficas de 21 pacientes com aspergilose pulmonar crônica (APC).
Continuação

Caso	Sexo; Idade (anos)	Classificação de APC	Tempo do primeiro diagnóstico de TB (anos)	TBP atual no diagnóstico de APC (método diagnóstico laboratorial)	Micológico direto	Cultura (espécie)	DID	ELISA (UI/mL)	Doença de base	Sintomatologia	Achados tomográficos	Última observação clínica
5	M; 67	APCC	2	Não	Neg	Neg	Neg	Pos (15,97)	Não	Tosse e hemoptise.	Cavidades múltiplas em lobo direito e esquerdo, espessamento pleural e presença de bola fúngica.	Satisfatória
6	M; 42	APCC	1	Sim (Clínico)	Neg	Neg	Pos	Pos (>80)	DM	Febre, tosse, hemoptise, astenia, sudorese noturna e perda de peso > 10%.	Cavidades múltiplas em lobo esquerdo, espessamento pleural, presença de bola fúngica.	Óbito
7	F; 34	APCC	7	Sim (Baciloscopia e cultura positivas)	Neg	Neg	-	-	Não	Febre, tosse, expectoração, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidades múltiplas em lobo direito e esquerdo, espessamento pleural, nódulos e presença de bola fúngica.	Satisfatória
8	M; 67	APCC	3	Não	Neg	Neg	Pos	Pos (> 80)	DM e HAS	Tosse, hemoptise e astenia.	Cavidade simples com parede espessa em lobo esquerdo, espessamento pleural e presença de bola fúngica.	Óbito

Quadro S1 – Características clínicas, laboratoriais e tomográficas de 21 pacientes com aspergilose pulmonar crônica (APC).
Continuação

Caso	Sexo; Idade (anos)	Classificação de APC	Tempo do primeiro diagnóstico de TB (anos)	TBP atual no diagnóstico de APC (método diagnóstico laboratorial)	Micológico direto	Cultura (espécie)	DID	ELISA (UI/mL)	Doença de base	Sintomatologia	Achados tomográficos	Última observação clínica
9	M; 69	APCC	3	Não	Pos	Neg	Neg	Neg	DM, HAS e IRC	Tosse, hemoptise, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidade simples com paredes espessas em lobo direito, espessamento pleural, nódulos e presença de bola fúngica.	Óbito
10	M; 43	APCC	15	Não	Neg	Neg	Neg	Neg	Não	Febre, tosse, expectoração e hemoptise.	Cavidade simples em lobo direito, espessamento pleural discreto e presença de bola fúngica.	Satisfatória
11	M; 62	APCC	33	Não	Neg	Neg	Neg	Indeterminado (9,00)	DM e DPOC	Tosse, expectoração e hemoptise.	Cavidade simples com parede fina em lobo direito, espessamento pleural discreta, nódulos e presença de bola fúngica.	Satisfatória
12	M; 80	APCC	5	Não	Neg	Neg	Neg	Pos (61,99)	Não	Febre, tosse e perda de peso > 10%.	Cavidade simples em lobo esquerdo, espessamento pleural, nódulos e presença de bola fúngica.	Satisfatória

Quadro S1 – Características clínicas, laboratoriais e tomográficas de 21 pacientes com aspergilose pulmonar crônica (APC).
Continuação

Caso	Sexo; Idade (anos)	Classificação de APC	Tempo do primeiro diagnóstico de TB (anos)	TBP atual no diagnóstico de APC (método diagnóstico laboratorial)	Micológico direto	Cultura (espécie)	DID	ELISA (UI/mL)	Doença de base	Sintomatologia	Achados tomográficos	Última observação clínica
13	M; 67	APCC	8	Não	Neg	Neg	Neg	Pos (> 80,00)	Não	Dispneia e hemoptise.	Cavidade simples em lobo direito e presença de bola fúngica.	Progressão para espessamento pleural, aumento de cavidade com paredes espessas.
14	M; 53	APCC	7	Sim (Baciloscopia e cultura positivos)	Neg	Neg	Neg	Neg	DPOC	Febre, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidades múltiplas em lobo direito e esquerdo, espessamento pleural, bola fúngica.	Óbito
15	M; 61	APCC	8	Sim (Clínico)	Neg	Neg	Pos	Pos (> 80,00)	Espondilite anquilosante	Febre, tosse, expectoração, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidade simples em lobo esquerdo, espessamento pleural, lesão espessa e irregular dentro da cavidade.	Satisfatória
16	F; 59	APCC	19	Não	Pos	Neg	Neg	Pos (> 80,00)	HAS e DPOC	Febre, tosse, expectoração, hemoptise, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidades múltiplas em lobo direito, espessamento pleural e presença de bola fúngica.	Satisfatória

Quadro S1 – Características clínicas, laboratoriais e tomográficas de 21 pacientes com aspergilose pulmonar crônica (APC).
Continuação

Caso	Sexo; Idade (anos)	Classificação de APC	Tempo do primeiro diagnóstico de TB (anos)	TBP atual no diagnóstico de APC (método diagnóstico laboratorial)	Micológico direto	Cultura (espécie)	DID	ELISA (UI/mL)	Doença de base	Sintomatologia	Achados tomográficos	Última observação clínica
17	M; 62	APCC	<1	Sim (Baciloscopia)	Neg	Neg	Neg	Pos (13,96)	HAS e DPOC	Febre, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidades múltiplas em lobo direito e esquerdo, espessamento pleural, nódulos.	Óbito
18	M; 67	APCC	50	Não	Neg	Neg	-	-	HAS e DPOC	Dispneia.	Cavidade simples com paredes espessas em lobo direito e presença de bola fúngica.	Satisfatória (houve progressão radiológica)
19	M; 62	APCC	<1	Sim (baciloscopia)	Neg	Neg	-	-	Não	Febre, tosse, expectoração, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidade múltipla em lobo direito, espessamento pleural e presença de bola fúngica.	Óbito
20	F; 63	APCC	45	Não	Pos	Pos (<i>Aspergillus spp</i>)	Eg	Pos (19,64)	DPOC	Febre, tosse, expectoração, hemoptise, astenia e perda de peso > 10%.	Cavidade simples em lobo esquerdo, espessamento pleural e presença de bola fúngica.	Satisfatória
21	M; 27	APCC	5	Não	Pos	Pos (AF)	Pos	Pos (> 80,00)	Não	Tosse, expectoração, hemoptise e astenia.	Cavidades múltiplas em lobo direito, espessamento pleural e presença de bola fúngica.	Satisfatória

APC: aspergilose pulmonar crônica; AS: aspergiloma simples; APCC: aspergilose pulmonar cavitária crônica; APFC: aspergilose pulmonar fibrosante crônica; Pos: positiva; Neg: negativa; DM: diabetes mellitus; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; HAS: hipertensão arterial sistêmica; AF: *Aspergillus fumigatus*; M: masculino; F: feminino; TBP: tuberculose pulmonar; IDD: imunodifusão em gel de ágar; ELISA: teste imunoenzimático.

A sensibilidade de IDD foi de 35,7% e de 29,4% quando usamos os padrões de referência 1 e 2 respectivamente; a sensibilidade do ELISA foi de 88,9% e 76,5% quando usamos os padrões de referência 3 e 4 respectivamente. A especificidade da IDD e do ELISA foi de 100% e 99%, respectivamente (tabelas 6 e 7). O coeficiente de concordância de Kappa entre os dois testes foi 0,534, com grau de concordância moderado. O Índice de Youden variou de 0,35 e 0,29 para IDD e de 0,88 e 0,76 para ELISA, conforme os padrões de referência descritos.

Não foram observadas reações cruzadas do teste ELISA em 20 pacientes com PCM e em 119 pacientes com TBP sem APC.

Tabela 6. Análises de acurácia do teste de imunodifusão dupla (IDD) para o diagnóstico de aspergilose pulmonar crônica (APC) utilizando dois padrões de referência 1 e 2.

IDD	Referência 1 (95% IC)	Referência 2 (95% IC)
Sensibilidade (%)	35,7 (12,8-64,9)	29,4 (10,3-56,0)
Especificidade (%)	100 (96,4-100)	
Valor preditivo positivo (%)	100 (46,3-100)	
Valor preditivo negativo (%)	91,7 (88,3-94,3)	89,3 (86,0-92,0)
Razão de verossimilhança positiva	Infinito	Infinito
Razão de verossimilhança negativa	0,64 (0,44-0,95)	0,71 (0,52-0,96)
Acurácia (%)	92,1 (85,5-96,3)	89,7 (82,8-94,6)
Teste de Youden	0,35	0,29

Referência 1- Casos confirmados com microbiologia ou ELISA (n=14);

Referência 2- Casos prováveis ou confirmados com microbiologia ou ELISA (n=17);

Para análises de acurácia, o grupo controle foi constituído de 100 indivíduos saudáveis, doadores de sangue.

Tabela 7. Análises de acurácia do teste imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico de aspergilose pulmonar crônica (APC) utilizando dois padrões de referência 3 e 4.

ELISA	Referência 3 95% (IC)	Referência 4 95% (IC)
Sensibilidade (%)	88,9 (51,8-99,7)	76,5 (50,1-93,2)
Especificidade (%)	99,0 (94,6-100)	
Valor preditivo positivo (%)	88,9 (53,0-98,3)	92,9 (64,5-98,9)
Valor preditivo negativo (%)	99 (94,0-99,8)	96,1 (91,3-98,3)
Razão de verossimilhança positivo	88,9 (12,5-633,5)	76,5 (10,7-547,2)
Razão de verossimilhança negativo	0,11 (0,02-0,71)	0,24 (0,10-0,56)
Acurácia (%)	98,2 (93,5-99,8)	95,7 (90,3-98,6)
Teste de Youden	0,88	0,76

Referência 3- Casos confirmados com microbiologia ou IDD (n=9);

Referência 4. Casos prováveis ou confirmados com microbiologia ou IDD (n= 17);

Para análises de acurácia, o grupo controle foi constituído de 100 indivíduos saudáveis, doadores de sangue.

Discussão

A presente investigação encontra-se alicerçada em estudo transversal de base populacional, em amostra probabilística de tamanho adequado e com nenhuma perda. Os principais achados deste estudo foram prevalência de APC igual a 10,9% em pacientes com TBC em atividade ou com suas sequelas, baixa frequência de diagnóstico micológico, maior sensibilidade do teste sorológico ELISA Platelia® que a da IDD, elevada prevalência de bola fúngica, cavidade e espessamento pleural à tomografia computadorizada de tórax e, por fim, elevada letalidade de pacientes com e sem APC.

Poucos estudos baseados na apresentação clínica, imagens tomográficas, achados microbiológicos e sorológicos foram realizados para definir a prevalência de APC em indivíduos com TBP no mundo [3, 24, 25, 26]. A taxa de prevalência de 10,9% observada em nosso estudo encontra-se entre as maiores taxas de prevalência relatadas em estudos metodologicamente semelhantes ao nosso, variando de 2,3 a 13,7% (Figura 2).



Legenda:

- Brasil: 10,9 % (IC 95%: 7,2%-16,1%) - este estudo
- Irã: 2,4% (aspergiloma) e 11,3% (APCC) - Hedayati et al, 2015 [24]
- Nigéria: 8,7% - Oladele et al, 2017 [25]
- Uganda: 4,9 a 6,3% - Page et al, 2019 [3]
- Taiwan: 2,3% - Lee et al, 2020 [26]

Figura 2. Mapa mundial mostrando as prevalências de aspergilose pulmonar crônica em indivíduos com tuberculose pulmonar, que consideraram para o diagnóstico de APC, critérios clínicos, tomográficos, microbiológicos e sorológicos.

Vários outros estudos também são relatados, porém as prevalências de APC são baseadas somente em testes sorológicos ou em exames de imagem e, em populações outras além de TBP [13, 27-39].

A prevalência de APC na TBP no Brasil é muito pouco estudada, existindo somente um estudo prévio, em 1988, que avaliou a prevalência de APC em pacientes com qualquer doença respiratória de base, não exclusivamente TBP, utilizando RX tórax e triagem sorológica com IDD, que encontrou 8,3% [28]. Além disso, há uma publicação de 2015 de uma estimativa de incidência de 6,2 casos de APC por 100.000 habitantes no Brasil, baseada nas notificações de TBP, utilizando um software para cálculo de estimativa de incidência, proposto pela *Leading International Fungal Education (LIFE)*, para melhorar a compreensão da escala do número de infecções fúngicas graves em todo o mundo e em cada país de forma individual [6, 40]. Na figura 2 apresentamos a distribuição mundial das

estimativas de incidência de APC na TBP, desde 2011. A menor e as maiores incidências estimadas foram de 1 caso por 100.000 habitantes na Suécia [41], a 78 casos por 100.000 habitantes na Nigéria [42] e Filipinas [43]. Em 2011, a estimativa global de incidência de APC era de 18 casos de APC por 100.000 habitantes [6] e em 2017 foi estimada em 22 casos por 100.000 habitantes [44].

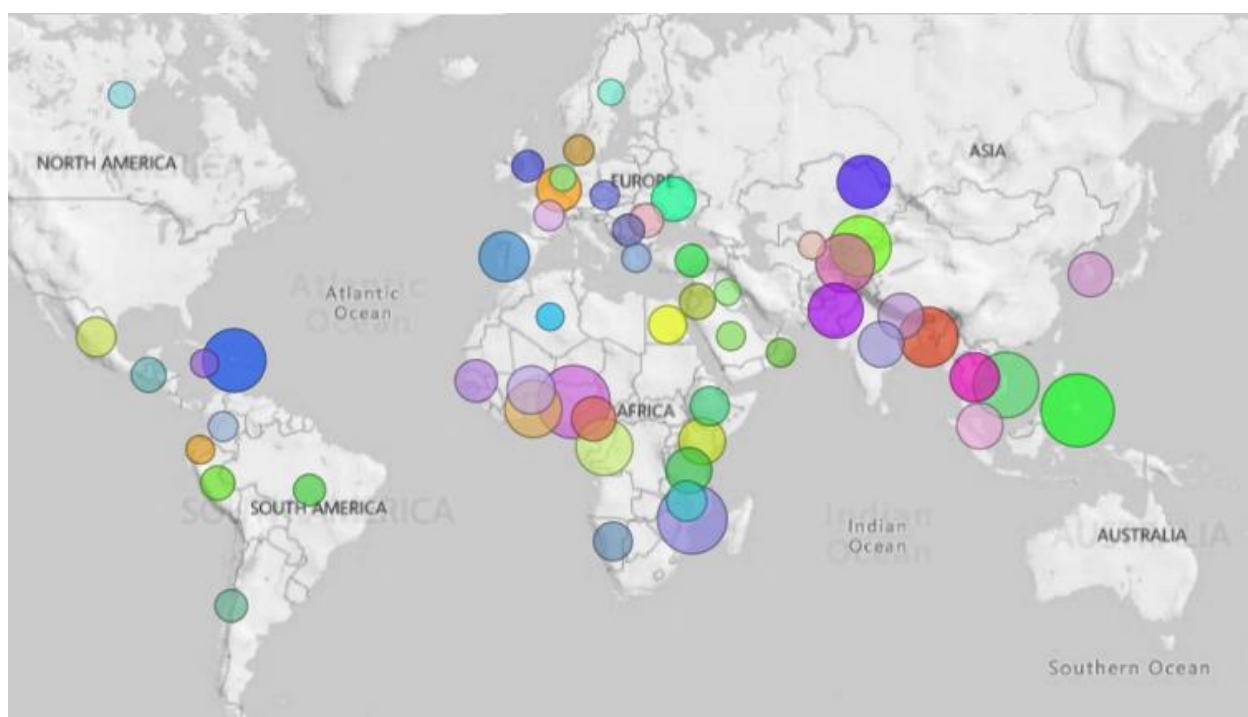


Figura 3. Distribuição mundial de incidência de aspergilose pulmonar crônica em tuberculose pulmonar baseada nas estimativas do LIFE a partir de 2011 [2, 41-43, 45-75].

O Brasil é um dos 30 países com alta carga de TB no mundo [4], desta forma, conhecer a prevalência de APC nesta população é fundamental para a identificação de estratégias para o seu diagnóstico, tratamento e redução de mortalidade.

A prevalência estimada de APC tem aumentado em várias regiões provavelmente devido à melhoria no diagnóstico [2]. A instalação da APC é insidiosa e crônica e as formas fúngicas inaladas alcançam o parênquima pulmonar com alterações estruturais, como as escavações provocadas pela tuberculose [76].

Em nosso estudo observou-se que pacientes com APC tinham tido TBP prévia há mais tempo que os sem APC. A doença frequentemente permanece não diagnosticada por anos, sendo observada maior ocorrência de casos de aspergiloma após três anos com cavidade como seqüela de TBP [13]. Novos casos de APC podem ser identificados em até nove anos

após completo tratamento de terapia para TBP [3]. Cabe ressaltar que o diagnóstico de APC em suas fases iniciais ainda é difícil, e que mesmo assim foi possível diagnosticar APC em pacientes no seu primeiro episódio de TBP.

Hemoptise é um dos sintomas mais específicos e graves da APC e pode ser observada em mais da metade dos pacientes, podendo ser fatal. Isso também foi observado em nosso estudo e justifica-se pela neovascularização da artéria brônquica em torno da área envolvida, com hipertrofia dos vasos, hipervascularização colateral, parietal, intercostal e transpleural provocada pelo processo inflamatório. Além disso, outros mecanismos podem colaborar com a frequência de hemoptise, como o atrito e erosão no epitélio vascularizado causados pela bola fúngica, a presença de endotoxinas e/ou enzimas fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus* e reações de hipersensibilidade mediada por imunocomplexos na parede da cavidade [76, 77,78,79].

Em cerca de um quarto de nossos pacientes com APC, o exame micológico direto de escarro ou outra amostra respiratória pôde mostrar hifas hialinas septadas sugestivas de *Aspergillus* spp. A microscopia é uma ferramenta importante e consistente no diagnóstico de APC, pois está menos sujeita à contaminação ambiental do que a cultura [9].

As espécies patogênicas de *Aspergillus* são comumente encontradas no ar ambiente, então o crescimento desses fungos em meio de cultura deve ser interpretado com cuidado, pois podem ser falso-positivas. O isolamento de *Aspergillus* de várias colônias da mesma amostra ou de diferentes amostras do mesmo paciente reforça o diagnóstico, especialmente se o micológico direto resultou positivo. *A. fumigatus* foi a espécie mais prevalente entre os pacientes com APC, em concordância com outro estudo [24]. Observou-se o isolamento de *Aspergillus niger* (*A. niger*) de amostra respiratória de seis pacientes sem diagnóstico de APC. Em um estudo de prevalência de infecção fúngica em pacientes com TB, entre os isolados de *Aspergillus* spp, 37,5% foram *A. niger* [80]. O isolamento de *A. niger* levanta duas possibilidades: 1. Contaminação das amostras, justificadas pela ausência do micológico direto positivo, que pode ser observada nesses pacientes; 2. Colonização inicial de pacientes que deverão ser monitorizados para uma possível evolução para APC.

De forma geral, a sensibilidade do ELISA Platelia foi maior do que de IDD. Entretanto, a especificidade do IDD foi maior do que o de ELISA Platelia, a semelhança do que tem sido demonstrado em outros estudos [12]. A IDD também é uma ferramenta importante no controle do tratamento, por mostrar redução dos títulos com a melhora clínica [81].

Na avaliação pelo Índice de Youden que avalia o desempenho de testes sorológicos, observou-se, também, um melhor desempenho do teste ELISA, o que já tinha sido demonstrado em uma revisão sistemática [12], onde o Índice de Youden dos testes ImmunoCAP e Immulite variaram entre 0,94 a 0,96 [82, 83].

Não foram observadas reações cruzadas com PCM e TBP em atividade no teste de ELISA Platelia, diferentemente do encontrado em um estudo com teste ELISA *in house*, que detectou anticorpos IGG anti-*Aspergillus* em pacientes com essas doenças, bem como em pacientes com histoplasmose e criptococose [81].

Deste modo, entendemos que o teste ELISA deva ser preferido e usado na investigação diagnóstica da APC em todos os pacientes com tosse recorrente, hemoptise ou perda de peso após tratamento de TBP, e em pacientes onde tratamento empírico para TBP com escarros negativos para BAAR estão sendo considerados [3]. Além disso, há grande importância de investigação de APC em pacientes com TBP em atividade, pois em nosso estudo APC foi identificada em seis pacientes com TBP ativa, sendo que cinco deles tiveram TBP confirmada por baciloscopia, cultura ou método molecular.

Para os cálculos de acurácia dos testes sorológicos, os testes índices não foram considerados nos critérios de confirmação diagnóstica de APC. Desta forma, quatro padrões de referência foram estabelecidos, sendo os padrões 1 e 3 representando o padrão-ouro estabelecido para diagnóstico de APC, baseado na confirmação microbiológica e, ou sorológica; e, para as referências 2 e 4 utilizamos todos os casos confirmados e prováveis para cálculo, representando os casos observados na prática clínica, isto é, mais próximo do que ocorre na vida real.

A prevalência de bola búngica foi muito maior (90,5%) em nossos pacientes do que tem sido relatado [3, 39]. Essa diferença de prevalência pode ser devida ao fato de que os participantes do estudo foram alocados em hospitais de referência, para onde são encaminhados casos com quadros mais sugestivos.

Espessamento pleural observada à TC de tórax foi muito frequente (95%) em pacientes com APC. Ausência de espessamento pleural adjacente à cavidade pulmonar observada na radiografia de tórax foi demonstrada ter 100% de VPN no diagnóstico de APC [3]. O mesmo estudo demonstrou que quando associado à sorologia positiva o VPP alcança 76,5%. Portanto, atenção especial deve ser dada a este achado radiológico no diagnóstico de APC [15].

Os achados tomográficos têm extrema importância para países como o Brasil, principalmente em casos prováveis, devido à dificuldade de confirmação microbiológica com necessidade de laboratórios especializados e a não padronização do teste ELISA como teste de referência para o diagnóstico de APC.

No presente estudo, a prevalência de APC em pacientes com cavidade foi de 22,3%, sendo um dado extremamente importante na definição do principal fator de risco para o desenvolvimento de APC, como também foi apresentando por Page et al [3] que encontraram uma prevalência de 26,1%. Indivíduos com cavidades residuais por TBP em radiografia de tórax apresentam uma taxa de incidência anual de APC de 6,5% [3]. Considerando que cavidade residual em radiografia de tórax pode ser identificada em 20 a 30% de 7,7 milhões de pacientes tratados para TBP a cada ano, é possível dimensionar a magnitude da carga de APC no mundo [4].

De forma geral, pacientes com mais de quatro anos de tratamento de TBP apresentaram maior prevalência de APC. A APC se estabelece insidiosamente nas alterações anatômicas decorrentes da TBP, que primeiro são colonizadas e a progressão da infecção e doença é lenta. A doença instalada é grave.

Em nosso estudo, a frequência de óbitos em curto de tempo de avaliação entre os pacientes com APC foi de 28,6% e isso representa a gravidade de evolução em casos não tratados. As taxas de mortalidade em pacientes com APC em 5 anos tem variado de 17,5 a 85% [3, 84], a depender de vários fatores, incluindo a doença de base.

Além da evolução para o óbito, a APC pode progredir por meses ou anos resultando em significativa perda da capacidade funcional e declínio na qualidade de vida [32], reforçando a importância do diagnóstico e tratamento em tempo oportuno, com antifúngico oral ou cirurgia em casos selecionados [35].

A presente pesquisa apresentou algumas limitações: 1) a amostra utilizada foi feita por conveniência em dois hospitais de referência e os pacientes que aceitaram participar da pesquisa na sua grande maioria era sintomática, portanto não foram identificados casos de aspergiloma simples; 2) o cálculo da amostra foi realizado para o estudo de prevalência, para o estudo de acurácia o número da amostra foi pequeno e refletiu em um amplo intervalo de confiança dentro dos parâmetros de desempenho dos testes.

Apesar de sua importância, o teste ELISA para detecção de anticorpos IgG específicos para *Aspergillus*, ainda não apresenta acurácia diagnóstica bem definida para APC e outros estudos ainda são necessários [15].

A prevalência e gravidade de APC em pacientes tratados de TBP observada em nosso estudo justifica a investigação desta micose negligenciada em todos os pacientes com TBP, antes e depois do tratamento. Além da avaliação clínica, a tomografia e teste sorológico com ELISA são ferramentas importantes para essa investigação.

Referências

1. Brown GD, Denning DW, Gow NA et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4: 165rv13.
2. Barac A, Kosmidis C, Alastruey-Izquierdo A, Salzer HJF. On behalf of CPA-net. Chronic pulmonary aspergillosis update: A year in review. *Medical Mycology.* 2019; 57:S104-S109.
3. Page ID, Byanyima R, Hosmane S, Onyachi N, Opira C, Richardson M, et al. Chronic pulmonary aspergillosis commonly complicates treated pulmonary tuberculosis with residual cavitation. *Eur Resp J.* 2019;53: 1801184.
4. World Health Organization. WHO Global tuberculosis report. 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. World Health Organization. WHO Global tuberculosis report. 2017. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
6. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ.* 2011; 89: 864–872.
7. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2013; 41: 621–626.
8. Takazono T.; Izumikawa K. Recent advances in diagnosing chronic pulmonary aspergillosis. *Front Microbiol.* Vol. 9; p: 1810, 2018.
9. Denning DW, Page ID, Chakaya J, Jabeen K, Jude CM, Cornet M, et al. Case Definition of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Resource - Constrained Settings. *Emerging Infectious Diseases.* Vol. 24, n. 8, August 2018.
10. Uffredi ML, Mangiapan G, Cadranel J, Kac G. Significance of *Aspergillus fumigatus* Isolation from Respiratory Specimens of Nongranulocytopenic Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2003) 22:457–462.
11. Van Toorenbergen, AW. Between-laboratory quality control of automated analysis of IgG antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;74: 278-281.

12. Volpe-Chaves CE, Oliveira SMVL, Venturini J, Grande AJ, Sylvestre TF, Mendes RP, Paniago AMM. Accuracy of serological tests for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 15(3):e0222738.
13. British Tuberculosis Association. Aspergilloma and residual tuberculous cavities - The results of a resurvey. *Tubercle* 1970; 51: 227–245.
14. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. 2018; 49(11): 1 – 18.
15. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47: 45–68. pmid:26699723.
16. 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. Brasília: Anvisa, 2013.
17. Larone D. Medically important fungi: a guide to identification. 5ª. Ed., ASM Press, American Society of microbiology, Washington DC, 2011.
18. Ouchterlony D. Antigen-antibody reactions in gels: types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1953;32:231.
19. Freitas RS, Carvalho-Vivi JO, Zamboni IM, Assis CM, Costa-Martins JE, Vicentini-Moreira AP. The importance of serological assays in diagnosing acute pulmonary histoplasmosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2009;15(2):278-288.
20. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, et al. Fleischner Society: Glossary of terms for thoracic imaging *Radiology*. 2008 Mar; 246(3):697–772.
21. Fletcher RM, Fletcher SW, Wagner EH. *Clinical Epidemiology, the essentials*. 1st edition. Baltimore - USA: Wawerly; 1983.
22. Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159-74.
23. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3: 32-35.
24. Hedayati MT, Azimi Y, Droudinia A, Mousavi B, Khalilian A, Hedayati N, Denning DW. Prevalence of chronic pulmonary aspergillosis in patients with tuberculosis from Iran. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2015; 34: 1759–1765.
25. Oladele RO, Irurhe NK, Foden P, Akanmu AS, Gbaja-Biamila T, Nwosu A, Ekundayo HA, Ogunsola FT, Richardson MD, Denning DW. Chronic pulmonary aspergillosis as a cause of smear-negative TB and/or TB treatment failure in Nigerians. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2017; 21: 1056–1061.

26. Lee MR, Huang HL, Chen LC, Yang HC, Ko JC, Cheng MH, et al. Seroprevalence of *Aspergillus* IgG and disease prevalence of chronic pulmonary aspergillosis in a country with intermediate burden of tuberculosis: a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*; 26(8): 1091.e1-1091.e7, 2020 Aug.
27. Adebonojo SA, Osinowo O, Adebo O. Lung abscess: a review of three-years' experience at the University College Hospital, Ibadan. *J Natl Med Assoc* 1979; 71: 39–43.
28. Ferreira-Da-Cruz MF, Wanke B, Pirmez C, Galvão-Castro B. *Aspergillus fumigatus* fungus ball in hospitalized patients with chronic pulmonary disease. Usefulness of double immunodiffusion test as a screening procedure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1988; 83: 357–360.
29. Iwata H, Miwa T, Takagi K. [Pulmonary tuberculosis and mycotic infection--clinical and serological diagnosis]. *Kekkaku* 1989; 64: 7–13.
30. Shahid M, Malik A, Bhargava R. Prevalence of aspergillosis in chronic lung diseases. *Indian J. Med. Microbiol.* 2001; 19: 201–205.
31. Kurhade AM, Deshmukh JM, Fule RP, Chande C, Akulwar S. Mycological and serological study of pulmonary aspergillosis in central India. *Indian J. Med. Microbiol.* 2002; 20: 141–144.
32. Al-Shair K, Atherton GT, Harris C, et al. Long-term antifungal treatment improves health status in patients with chronic pulmonary aspergillosis: a longitudinal analysis. *Clin Infect Dis.* 2013; 57: 828-835.
33. Chen QK, Jiang GN, Ding JA. Surgical treatment for pulmonary aspergilloma: a 35-year experience in the Chinese population. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012; 15: 77–80.
34. Meawed TE, Fawzy MA, El Gamry RM, et al. Frequency of pulmonary fungal infection in Egyptian patients with re-treatment pulmonary tuberculosis and its clinical and radiological significance. *J Am Sci* 2012; 8: 683–691.
35. Ohba H, Miwa S, Shirai M, Kanai M, Eifuku T, Suda T, et al. Clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Respir. Med.* 2012; 106: 724–729.
36. Agarwal R, Vishwanath G, Aggarwal AN, Garg M, Gupta D, Chakrabarti A. Itraconazole in chronic cavitary pulmonary aspergillosis: a randomised controlled trial and systematic review of literature. *Mycoses*, 2013, 56, 559–570.
37. Kwizera R, Parkes-Ratanshi R, Page ID, Sekaggya-Wiltshire C, Musaazi J, Fehr J, et al. Elevated *Aspergillus*-specific antibody levels among HIV infected Ugandans with pulmonary tuberculosis. Kwizera et al. *BMC Pulmonary Medicine* (2017) 17:149.
38. Beltrán-Rodríguez N, Juan-Galán JLS, Andreu CMF, Year DM, Pita MB, Lancha MRP, et al. Chronic Pulmonary Aspergillosis in Patients with Underlying Respiratory Disorders in Cuba—A Pilot Study. *J. Fungi* 2019, 5, 18.

39. Jhun BW, Jeon K, Eom JS, Lee JH, Suh GY, Kwon OJ, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol.* 2013;51: 811–817.
40. Giacomazzi j, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC, in association with the LIFE program. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, 2016, 59, 145–150.
41. Özenci V, Klingspor L, Ullberg M, Chryssanthou E, Denning DW, Kondori N. Estimated burden of fungal infections in Sweden. *Mycoses.* 2019 Nov;62(11):1043-1048. doi: 10.1111/myc.12981. Epub 2019 Aug 25. PMID: 31376228.
42. Oladele RO, Denning DW. Burden of serious fungal infection in Nigeria. *West Afr J Med.* 2014 Apr-Jun;33(2):107-14. PMID: 25236826.
43. Batac MCR, Denning D. Serious fungal infections in the Philippines. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36, 937–941 (2017).
44. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel).* 2017 Oct 18;3(4):57. doi: 10.3390/jof3040057. PMID: 29371573; PMCID: PMC5753159.
45. Mohammad K, Ismael HM, Shekhany K, Al-Attraqhchi AAF, Abdullah SK, Aldabbagh R, Denning DW. Burden of serious fungal infection in Iraq. Conference: ESCMID 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious DiseasesAt: BarcelonaVolume: ECCMI-2416. April 2014.
46. Agarwal R, Denning DW, Chakrabarti A. Estimation of the burden of chronic and allergic pulmonary aspergillosis in India. *PLoS One.* 2014 Dec 5;9(12):e114745. doi: 10.1371/journal.pone.0114745. PMID: 25478929; PMCID: PMC4257713.
47. Gughani HC, Denning DW. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Jamaica by Literature Review and Modelling. *West Indian Med J.* 2015 Jun;64(3):245-9. doi: 10.7727/wimj.2014.204. Epub 2015 Apr 28. PMID: 26426178; PMCID: PMC4763900.
48. Faini D, Maokola W, Furrer H, Hatz C, Battegay M, Tanner M, Denning DW, Letang E. Burden of serious fungal infections in Tanzania. *Mycoses.* 2015 Oct;58 Suppl 5:70-9. doi: 10.1111/myc.12390. PMID: 26449510.
49. Badiane AS, Ndiaye D, Denning DW. Burden of fungal infections in Senegal. *Mycoses.* 2015 Oct;58 Suppl 5:63-9.
50. Beardsley J, Denning DW, Chau NV, Yen NT, Crump JA, Day JN. Estimating the burden of fungal disease in Vietnam. *Mycoses.* 2015 Oct;58 Suppl 5(Suppl Suppl5):101-6. doi: 10.1111/myc.12382. PMID: 26449514; PMCID: PMC4606745
51. Mortensen KL, Denning DW, Arendrup MC. The burden of fungal disease in Denmark. *Mycoses.* 2015 Oct;58 Suppl 5:15-21. doi: 10.1111/myc.12383. PMID:26449502.

52. Corzo-León DE, Armstrong-James D, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*. 2015 Oct;58 Suppl 5:34-44. doi:10.1111/myc.12395. PMID: 26449505.
53. Chrdle A, Mallátová N, Vašáková M, Haber J, Denning DW. Burden of serious fungal infections in the Czech Republic. *Mycoses*. 2015 Oct;58 Suppl 5:6-14. doi:10.1111/myc.12384. PMID: 26449501.
54. Khwakhali US, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Nepal. *Mycoses*. 2015 Oct;58 Suppl 5:45-50. doi: 10.1111/myc.12393. PMID: 26449506
55. Lagrou K, Maertens J, Van Even E, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Belgium. *Mycoses*. 2015 Oct;58 Suppl 5:1-5. doi: 10.1111/myc.12389. PMID: 26449500.
56. Osmanov A, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Ukraine. *Mycoses*. 2015 Oct;58 Suppl 5:94-100. doi: 10.1111/myc.12409. PMID: 26449513.
57. Gugnani HC, Denning DW. Burden of serious fungal infections in the Dominican Republic. *J Infect Public Health*. 2016 Jan-Feb;9(1):7-12. doi:10.1016/j.jiph.2015.04.026. Epub 2015 May 28. PMID: 26027476.
58. Gamaletsou MN, Drogari-Apiranthitou M, Denning DW, Sipsas NV. An estimate of the burden of serious fungal diseases in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Jul;35(7):1115-20. doi: 10.1007/s10096-016-2642-8. Epub 2016 Apr 16.
59. Guto JA, Bii CC, Denning DW. Estimated burden of fungal infections in Kenya. *J Infect Dev Ctries*. 2016 Aug 31;10(8):777-84. doi: 10.3855/jidc.7614. PMID:27580321.
60. Gangneux JP, Bougnoux ME, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, Dupont B; LIFE program, the Société française de mycologie médicale SFMM-study group. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med*. 2016 Dec;26(4):385-390.
61. Albarrag AM, Al-Abdely H, Abu Khalid NF, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Saudi Arabia. 2017.
62. Dufresne SF, Cole DC, Denning DW, Sheppard DC. Serious fungal infections in Canada. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36: 987-992.
63. Velayuthan D, Samudi C, Singh HKL, Peng Ng K, Shankar EM, Denning DW. Estimation of the Burden of Serious Human Fungal Infections in Malaysia Rukumani J. *Fungi* 2018, 4(38):1-8.
64. Kalua K, Zimba B, Denning DW. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Malawi. *J Fungi (Basel)*. 2018 May 21;4(2):61.
65. Arsenijević VA, Denning DW. Estimated Burden of Serious Fungal Diseases in Serbia. *J Fungi (Basel)*. 2018 Jun 25;4(3):76.

66. Sacarlal J, Denning DW. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Mozambique. *J Fungi (Basel)*. 2018 Jun 23;4(3):75.
67. Hilmioglu-Polat S, Seyedmousavi S, Ilkit M, Hedayati MT, Inci R, Tumbay E, Denning DW. Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses*. 2019 Jan;62(1):22-31.
68. Ocansey BK, Pesewu GA, Codjoe FS, Osei-Djarbeng S, Feglo PK, Denning DW. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Ghana. *J Fungi (Basel)*. 2019 May 11;5(2):38.
69. Bobokhojaev OI, Osmanov A, Aliev SP, Radjabzoda AS, Avgonov ZT, Manonov ST, Denning DW. The Burden of Serious Fungal Infections in Tajikistan. *J Fungi (Basel)*. 2019 Jul 21;5(3):68.
70. Turdumambetova GK, Osmanov A, Denning DW. The Burden of Serious Fungal Infections in Kyrgyzstan. *J Fungi (Basel)*. 2019 Jul 19;5(3):66.
71. Dunaiski CM, Denning DW. Estimated Burden of Fungal Infections in Namibia. *J Fungi (Basel)*. 2019 Aug 16;5(3):75.
72. Tufa TB, Denning DW. The Burden of Fungal Infections in Ethiopia. *J Fungi (Basel)*. 2019 Nov 22;5(4):109.
73. Buil JB, Meijer EFJ, Denning DW, Verweij PE, Meis JF. Burden of serious fungal infections in the Netherlands. *Mycoses*. 2020 Jun;63(6):625-631.
74. Amona FM, Denning DW, Moukassa D, Hennequin C. Current burden of serious fungal infections in Republic of Congo. *Mycoses*. 2020 Jun;63(6):543-552.
75. Al-Hatmi AMS, Al-Shuhoumi MA, Denning DW. Estimated Burden of Fungal Infections in Oman. *Journal of Fungi*. 2021; 7(1):5.
76. Kanj A, Abdallah N, Soubani AO. The spectrum of pulmonary aspergillosis. *Respiratory Medicine*. 2018.
77. Babatasi, G., Massetti, M., Chapelier, A., Fadel, E., Macchiarini, P., Khayat, A., & Dartevelle, P. (2000). Surgical treatment of pulmonary aspergilloma: Current outcome. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 119(5), 906–912.
78. Solit RW, McKeown-Jr JJ, Smullens S, Fraimow W. The surgical implications of intracavitary mycetomas (fungus balls). *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1971 Sep;62(3):411-22.
79. Silva PSMP, Marsico GA, Araujo MAF, Braz FSV, Santos HTAS, Loureiro GL, Fontes A. Tratamento do aspergiloma pulmonar complexo por cavernostomia Complex pulmonary aspergilloma treated by cavernostomy. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2014; 41(6): 406-411.
80. Sivasankari S, Senthamarai S, Anitha C et al. Prevalence of invasive aspergillosis among (PTB) patients in Kanchipuram, India. *J Clin Diagn Res*. 2014 8(3):22–23.

81. Azevedo PZ, Sylvestre TF, Cavalcante RS, Carvalho LR, Moris DV, Oliveira MLCS, et al. Evaluation of the double agar gel immunodiffusion test and of the enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and follow-up of patients with chronic pulmonary aspergillosis. *PLoS One*. 2015;10: 1-16.
82. Page ID, Richardson MD, Denning DW. Comparison of six *Aspergillus*-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). *J Infect*. 2016;72: 240-249.
83. Sehgal IS, Choudhary H, Dhooria S, Aggarwal AN, Garg M, Chakrabarti A, et al. Diagnostic cut-off of *Aspergillus fumigatus*-specific IgG in the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Mycose*. 2018;61: 770-s776.
84. Lowes D, Al-Shair K, Newton PJ et al. Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J*. 2017; 49.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo, apresentado em dois artigos, permite as seguintes conclusões:

Artigo 1. Acurácia de testes sorológicos para o diagnóstico de aspergilose pulmonar crônica: uma revisão sistemática e meta-análise.

- Os testes sorológicos baseados em precipitinas são muito trabalhosos, requerendo laboratórios especializados e apresentando baixa sensibilidade para o diagnóstico de APC.
- Testes de ELISA *in-house* não apresentam concentrações e antígenos padronizados para estudos comparativos
- Testes de ELISA comerciais demonstraram melhor acurácia para o diagnóstico de APC, mas estudos bem desenhados para identificar o melhor valor de *cut-off* devem ser realizados;
- Sistemas Immulite e ImmunoCAP demonstraram melhor acurácia entre os testes comerciais.

Artigo 2. Prevalência de aspergilose pulmonar crônica e acurácia de testes sorológicos em pacientes com tuberculose na região Centro-Oeste do Brasil.

- A taxa de prevalência de aspergilose pulmonar crônica (APC) em pacientes com tuberculose pulmonar (TBP) tratada ou em atividade foi de 10,9% (IC 95%: 7,2 % - 16,1%). Foi o primeiro estudo brasileiro em pacientes tratados ou em tratamento de TBP e, considerando que o Brasil possui alta carga de tuberculose, a taxa encontrada aponta para a magnitude da APC no país.
- Pacientes que tiveram TBP há mais de quatro anos e os que apresentavam hemoptise tiveram 17,5 e 9,6 maior chance de ter APC. A frequência de óbitos em pacientes com APC foi de 28,6%, durante o curto período de observação.
- Teste ELISA Platelia® apresentou melhor acurácia do que a IDD para o diagnóstico de APC. Não foram observadas reações cruzadas com PCM e TBP em atividade no teste de ELISA.

7 RECOMENDAÇÕES

Os resultados do presente estudo nos permitem sugerir as seguintes recomendações:

- Pacientes com TBP principalmente aqueles com persistência de cavidades devem ser submetidos à investigação cuidadosa de APC, antes, ao final e após o tratamento.
- A investigação deverá ser realizada sempre que ocorrerem novos sintomas respiratórios, principalmente hemoptise; bem como a cada seis meses em pacientes assintomáticos, para identificação de APC em fase precoce.
- A investigação deve ser feita com a avaliação clínica, TC de tórax e teste de IgG anti-*Aspergillus* por ELISA.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.; DENNING, D.W.; CHAKRABARTI, A. Estimation of the burden of chronic and allergic pulmonary aspergillosis in India. *PLoS One*, Vol. 9, n. 12, p. e114745, 2014.
- AGARWAL, R.; VISHWANATH, G.; AGGARWAL, A.N.; et al. Itraconazole in chronic cavitary pulmonary aspergillosis: a randomised controlled trial and systematic review of literature. *Mycoses*, Vol. 56, p. 559–570, 2013.
- AMONA, F.M.; DENNING, D.W.; MOUKASSA, D.; HENNEQUIN, C. Current burden of serious fungal infections in Republic of Congo. *Mycoses*, Vol. 63, n. 6, p. 543-552, 2020.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CADRANEL, J.; FLICK, H.; GODET, C.; HENNEQUIN, C.; HOENIGL, M.; KOSMIDIS, C.; LANGE, C.; MUNTEANU, O.; PAGE, I.; SALZER, H.J.F.; on behalf of CPAnet. Treatment of chronic pulmonary aspergillosis: current standards and future perspectives. *Respiration*, Vol. 96, p. 159–170, 2018.
- ALBARRAG, A.M.; AL-ABDELY, H.; ABU KHALID, N.F.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infections in Saudi Arabia. 2017.
- AL-HATMI, A.M.S.; AL-SHUHOUMI, M.A.; DENNING, D.W. Estimated Burden of Fungal Infections in Oman. *Journal of Fungi*, Vol. 7, n. 1, p. 5, 2021.
- AL-SHAIR, K.; ATHERTON, G.T.; HARRIS, C.; et al. Long-term antifungal treatment improves health status in patients with chronic pulmonary aspergillosis: a longitudinal analysis. *Clin Infect Dis*, Vol. 57, p. 828-835, 2013.
- AMONA, F.M.; DENNING, D.W.; MOUKASSA, D.; HENNEQUIN, C. Current burden of serious fungal infections in Republic of Congo. *Mycoses*, Vol. 63, n. 6, p. 543-552, 2020.
- ARSENJEVIC, V.A.; DENNING, D.W. Estimated Burden of Serious Fungal Diseases in Serbia. *J Fungi (Basel)*, Vol. 4, n. 3, p.76, 2018.
- AZEVEDO, P.Z.; SYLVESTRE, T.F.; CAVALCANTE, R.S.; CARVALHO, L.R.; MORIS, D.V.; OLIVEIRA, M.L.C.S.; et al. Evaluation of the double agar gel immunodiffusion test and of the enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and follow-up of patients with chronic pulmonary aspergillosis. *PLoS One*, Vol. 10, p. 1-16, 2015.
- BADIANE, A.S.; NDIAYE, D.; DENNING, D.W. Burden of fungal infections in Senegal. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 63-9, 2015.
- BARAC, A.; KOSMIDIS, C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; SALZER, H.J.F.; on behalf of CPAnet. Chronic pulmonary aspergillosis update: A year in review. *Medical Mycology*, Vol. 57, p. S104-S109, 2019.
- BARTON, R.C. *Aspergillus precipitans* and serology. In: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Dordrecht: Springer, p. 159-169, 2010.

BATAK, M.C.R.; DENNING, D. Serious fungal infections in the Philippines. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Vol. 36, p. 937–941, 2017.

BAXTER, C.G.; DENNING, D.W.; JONES, A.M.; TODD, A.; MOORE, C.B.; RICHARDSON, M.D. Performance of two *Aspergillus* IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*, Vol. 19, p. E197-E204, 2013.

BEARDSLEY, J.; DENNING, D.W.; CHAU, N.V.; YEN, N.T.; CRUMP, J.A.; DAY, J.N. Estimating the burden of fungal disease in Vietnam. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 101-6, 2015.

BELTRÁN-RODRÍGUEZ, N.; JUAN-GALÁN, J.L.S.; ANDREU, C.M.F.; YEAR, D.M.; PITA, M.B.; LANCHI, M.R.P.; et al. Chronic Pulmonary Aspergillosis in Patients with Underlying Respiratory Disorders in Cuba—A Pilot Study. *J. Fungi*, Vol. 5, p. 18, 2019.

BENNETT, J.W. An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, p. 1-17, 2010.

BIGNELL, E.; ICHEOKU, U.; van RHIJN, N., et al. Anti-*Aspergillus* activities of the respiratory epithelium in health and disease. *J Fungi*, Vol. 4, p. 8, 2018.

BOBOKHOJAEV, O.I.; OSMANOV, A.; ALIEV, S.P.; RADJABZODA, A.S.; AVGONOV, Z.T.; MANONOV, S.T.; DENNING, D.W. The Burden of Serious Fungal Infections in Tajikistan. *J Fungi (Basel)*, Vol. 5, n. 3, p. 68, 2019.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*, Vol. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BONGOMIN, F.; GRACE, L.; BALUKU, J.B.; KWIZERA, R.; DENNING, D.W. Chronic Pulmonary Aspergillosis: Notes for a Clinician in a Resource-Limited Setting Where There Is No Mycologist. *J. Fungi*, 2020.

BOSSUYT, P.M.; REITSMA, J.B.; BRUNS, D.E.; GATSONIS, C.A.; GLASZIOU, P.P.; IRWIG, L.; et al. STARD 2015: An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Radiology*, Vol. 277, p. 826-832, 2015.

BRASIL, AGENCIA 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. Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública / Ministério da Saúde, Secretaria de

Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas, Vol. 49, n. 11, p. 1 – 18, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Março 2020. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-009.pdf>.

BRIK, A.; SALEM, A.M.; KAMAL, A.R.; ABDEL-SADEK, M.; ESSA, M.; El SHAHARAWY, M.; DEEBES, A.; BARY, K.A. Surgical outcome of pulmonary aspergilloma. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*, Vol. 34, p. 882–885, 2008.

BRITISH TUBERCULOSIS ASSOCIATION. *Aspergillus* in persistent lung cavities after tuberculosis. A report from the Research Committee of the British Tuberculosis Association. *Tubercle*, Vol. 49, p. 1-11, 1968.

BRITISH TUBERCULOSIS ASSOCIATION. Aspergilloma and residual tuberculous cavities – the results of a resurvey: a report from the Research Committee of the British Thoracic and Tuberculosis Association. *Tubercle*, Vol. 51, p. 227 – 245, 1970.

BROWN, G.D.; DENNING, D.W.; GOW, N.A.; et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, Vol. 4, p. 165rv13, 2012.

BUIL, J.B.; MEIJER, E.F.J.; DENNING, D.W.; VERWEIJ, P.E.; MEIS, J.F. Burden of serious fungal infections in the Netherlands. *Mycoses*, Vol. 63, n. 6, p. 625-631, 2020.

CAMPBELL, J.H.; WINTER, J.H.; RICHARDSON, M.D.; SHANKLAND, G.S.; BANHAM, S.W. Treatment of pulmonary aspergilloma with itraconazole. *Thorax*, Vol. 46, p. 839-841, 1991.

CAMUSET, J.; LAVOLÉ A.; WISLEZ, M.; et al. [Infections aspergillaires broncho-pulmonaires du sujet non immunodéprimé [Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient]. *Rev Pneumol Clin*, Vol. 63, p. 155–166, 2007.

CARAS, W.E.; PLUSS, J.L. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: pathologic outcome after itraconazole therapy. *Mayo Clin Proc*, Vol. 71, p. 25–30, 1996.

CASTRO, C.B.A.; COSTA, P.A.; RUFFINO-NETTO, A.; MACIEL, E.L.N.; KRITSKI, A.L. Avaliação de um escore clínico para rastreamento de suspeitos de tuberculose pulmonar. *Revista de Saúde Pública*, v. 45, n.6, p. 1110-1116, 2011.

CHEN, Q.K.; JIANG, G.N.; DING, J.A. Surgical treatment for pulmonary aspergilloma: a 35-year experience in the Chinese population. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, Vol. 15, p. 77–80, 2012.

CHRDLE, A.; MALLÁTOVÁ, N.; VASÁKOVÁ, M.; HABER, J.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infections in the Czech Republic. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 6-14, 2015.

COLEMAN, R.M.; KAUFMAN, L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *Appl Microbiol*, Vol. 23, p. 301-308, 1972.

COLLINS, M.M., et al., Effect of using multiple culture media for the diagnosis of noninvasive fungal sinusitis. *Am J Rhinol*, Vol 19, n. 1, p. 41-45, 2005.

CORZO-LEÓN, D.E.; ARMSTRONG-JAMES, D.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 34-44, 2015.

CRAMER, R.A.; RIVERA, A.; HOHL, T.M. Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned? *Curr Opin Infect Dis*, Vol. 24, p. 315-322, 2011.

DEEKS, J.; BOSSUYT, J.; GATSONIS, C. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy. In: 1.0.0 edn: The Cochrane Collaboration, 2013.

DENNING, D.W. Chronic forms of pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*, Vol. 7, n.2, p. 25-31, 2001.

DENNING, D.W.; RINIOTIS, K.; DOBRASHIAN, R.; et al. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis*, Vol. 37, n.3, p. S265–S280, 2003.

DENNING, D.; PLEUVRY, A.; COLE, D. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ*, Vol. 89, p. 864-872, 2011.

DENNING, D.; PLEUVRY, A.; COLE, D. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. *Eur Respir J*, Vol. 41, p. 621–626, 2013.

DENNING D.W.; CADRANEL, J.; BEIGELMAN-AUBRY, C.; ADER, F.; CHAKRABARTI, A.; BLOT, S.; ULLMANN, A.J.; DIMOPOULOS, G.; LANGE, C. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*, Vol. 47, p. 45-68, 2016.

DENNING, D.W.; PAGE, I.D.; CHAKAYA, J.; JABEEN, K.; JUDE, C.M.; CORNET, M.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BONGOMIN, F.; BOWYER, P.; CHAKRABARTI, A.; GAGO, S.; GUTO, J.; HOCHHEGGER, B.; HOENIGL, M.; IRFAN, M.; IRURHE, N.; IZUMIKAWA, K.; KIRENGA, B.; MANDUKU, V.; SAMIHAH, M.; OLADELE, R.O.; RICHARDSON, M.D.; TUDELA, J.L.R.; ROZALIYANI, A.; SALZER, H.J.F.; SAWER, R.; SIMUKULWA, N.F.; SKRAHINA, A.; SRIRUTTAN, C.; SETIANINGRUM, F.; WILOPO, B.A.P.; COLE, D.C.; GERAHUN, H. Case Definition of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Resource - Constrained Settings. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 24, n. 8, August 2018.

DESAI, S.R.; HEDAYATI, V.; PATEL, K.; HANSELL, D.M. Chronic aspergillosis of the lungs: unravelling the terminology and radiology. *Eur Radiol*, Vol. 25, p. 3100–7, 2015.

DOS SANTOS FELTRIN, A.F.; VENDRAMINI, S.H.F.; CHIARAVALLI NETO, F.; CORREA, A.P.V.; WERNECK, A.L.; SASAKI, A.S.G.M.S.; SAMTPS. M.L.S.G. Death in

patients with tuberculosis and diabetes: Associated factors. *Diabetes Research and Clinical Practices*, Vol. 120, p. 111-116, 2016.

DUFRESNE, S.F.; COLE, D.C.; DENNING, D.W.; SHEPPARD, D.C. Serious fungal infections in Canada. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Vol. 36, p. 987-992, 2017.

DUMOLLARD, C.; AILLY, S.; PERRIOT, S.; BRENIER-PINCHART, M.P.; SAINT-RAYMOND, C.; CAMARA, B.; et al. Prospective evaluation of a new *Aspergillus* IgG enzyme immunoassay kit for diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*, Vol. 54, p. 1236-1242, 2016.

DUNAISKI, C.M.; DENNING, D.W. Estimated Burden of Fungal Infections in Namibia. *J Fungi (Basel)*, Vol. 5, n. 3, p. 75, 2019.

DUPONT, B. Itraconazole therapy in aspergillosis: Study in 49 patients. *J. Am. Acad. Dermatol*, Vol. 23, p. 607–614, 1990.

EL-BABA, F.; GAO, Y.; SOUBANI, A.O. Pulmonary Aspergillosis: What the Generalist Needs to Know. *Am. J. Med*, 2020.

LEBEAU, B.; PELLOUX, H.; PINEL, C.; MICHALLET, M.; GOUT, J.P.; PISON, C.; DELORMAS, P.; BRU, J.P.; BRION, J.P.; AMBROISE-THOMAS, P. Itraconazole in the treatment of aspergillosis: A study of 16 cases. *Mycoses*, Vol. 37, p. 171–179, 1994.

MAGHRABI, F.; DENNING, D.W. The Management of Chronic Pulmonary Aspergillosis: The UK National Aspergillosis Centre Approach. *Curr. Fungal. Infect. Rep*, 2017.

MARGALIT, A.; KAVANAGH, K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiol Rev*, Vol. 39, p. 670–687, 2015.

FAINI, D.; MAOKOLA, W.; FURRER, H.; HATZ, C.; BATTEGAY, M.; TANNER, M.; DENNING, D.W.; LETANG, E. Burden of serious fungal infections in Tanzania. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 70-9, 2015.

FARID, S.; MOHAMED, S.; DEVBHANDARI, M.; KNEALE, M.; RICHARDSON, M.; SOON, S.Y.; JONES, M.T.; KRYSIAK, P.; SHAH, R.; DENNING, D.W.; et al. Results of surgery for chronic pulmonary Aspergillosis, optimal antifungal therapy and proposed high risk factors for recurrence—A National Centre' s experience. *J. Cardiothorac Surg*, Vol. 8, p. 180, 2013.

FAUX, A.; SHALE, D.J.; LANE, D.J. Precipitins and specific IgG antibody to *Aspergillus fumigatus* in a chest unit population. *Thorax*, Vol. 47, p. 48-52, 1992.

FELTON, T.W.; BAXTER, C.; MOORE, C.B.; et al. Efficacy and safety of posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis*, Vol. 51, p. 1383–1391, 2010.

FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; WANKE, B.; PIRMEZ, C.; GALVÃO-CASTRO, B. *Aspergillus fumigatus* fungus ball in hospitalized patients with chronic pulmonary disease. Usefulness of double immunodiffusion test as a screening procedure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 83, p. 357-360, 1988.

FLETCHER, R.M.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. Clinical Epidemiology, the essentials. 1st edition. Baltimore - USA: Wawerly; 1983.

FREITAS, R.S.; CARVALHO-VIVI, J.O.; ZAMBONI, I.M.; ASSIS, C.M.; COSTA-MARTINS, J.E.; VICENTINI-MOREIRA, A.P. The importance of serological assays in diagnosing acute pulmonary histoplasmosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, Vol. 15, n. 2, p. 278-288, 2009.

FUJIUCHI, S.; FUJITA, Y.; SUZUKI, H.; DOUSHITA K.; KURODA, H.; TAKAHASHI, M.; et al. Evaluation of a quantitative serological assay for diagnosing chronic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*, Vol. 54, p. 1496-1499, 2016.

GAGO, S.; DENNING, D.W.; BOWYER, P. Pathophysiological aspects of *Aspergillus* colonization in disease. *Medical Mycology*, Vol. 57, p. S219-S227, 2019.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; MILLINGTON, M.A.; DENNING, D.W.; COLOMBO, A.L.; PASQUALOTTO, A.C.; in association with the LIFE program. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, Vol. 59, p. 145–150, 2016.

GOTWAY, M.B.; DAWN, S.K.; CAOILI, E.M.; REDDY, G.P.; ARAOZ, P.A.; WEBB W.R. The radiologic spectrum of pulmonary *Aspergillus* infections. *J Comput Assist Tomogr*, Vol. 26, p. 159–73, 2002.

GUGNANI, H.C.; DENNING, D.W. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Jamaica by Literature Review and Modelling. *West Indian Med J*, Vol. 64, n. 3, p. 245-9, 2015.

GUGNANI, H.C.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infections in the Dominican Republic. *J Infect Public Health*, Vol. 9, n. 1, p. 7-12, 2016.

GAMALETSOU, M.N.; DROGARI-APIRANTHITOU, M.; DENNING, D.W.; SIPSAS, N.V. An estimate of the burden of serious fungal diseases in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Vol. 35, n. 7, p. 1115-20, 2016.

GUTO, J.A.; BII, C.C.; DENNING, D.W. Estimated burden of fungal infections in Kenya. *J Infect Dev Ctries*, Vol. 10, n. 8, p. 777-84, 2016.

GANGNEUX, J.P.; BOUGNOUX, M.E.; HENNEQUIN, C.; GODET, C.; CHANDENIER, J.; DENNING, D.W.; DUPONT, B.; LIFE program, the Société française de mycologie médicale SFMM-study group. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med*, Vol. 26, n. 4, p. 385-390, 2016.

GUITARD, J.; SENDID, B.; THOREZ, S.; GITS, M.; HENNEQUINA, C. Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, Vol. 50, p. 762-765, 2012.

HANSELL, D.M.; BANKIER, A.A.; MACMAHON, H.; et al. Fleischner Society: Glossary of terms for thoracic imaging Radiology. Vol. 246, N. 3, p. 697–772, 2008.

HANSEN, D.; BLAHOUT, B.; BENNER, D.; POPP, W. Environmental sampling of particulate matter and fungal spores during demolition of a building on a hospital area. *Journal of Hospital Infection*, Vol. 70, p. 259e264, 2008.

HARGREAVES, N.J.; KADZAKUMANJA, O.; PHIRI, S.; LEE C.H.; TANG, X.; SALANIPONI, F.M.; et al. Pneumocystis carinii pneumonia in patients being registered for smear-negative pulmonary tuberculosis in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Vol. 95, p. 402–8, 2001.

HE, B.; WAN, C.; ZHOU, W.; RUI, Y.; SHI, Y.; SU, X. Clinical profile and surgical outcome for different types of chronic pulmonary aspergillosis. *Am. J. Transl. Res*, Vol. 11, p. 3671–3679, 2019.

HEDAYATI, M.T.; AZIMI, Y.; DROUDINIA, A.; MOUSAVIL, B.; KHALILIAN, A.; HEDAYATI, N.; DENNING, D.W. Prevalence of chronic pulmonary aspergillosis in patients with tuberculosis from Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Vol. 34, p. 1759-1765, 2015.

HIGGINS, J.P.; THOMPSON, S.G.; DEEKS, J.J.; ALTMAN, D.G. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*, Vol. 327, p. 557-560, 2003.

HILMIOGLU-POLAT, S.; SEYEDMOUSAVI, S.; ILKIT, M.; HEDAYATI, M.T.; INCI, R.; TUMBAY, E.; DENNING, D.W. Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses*, Vol. 62, n. 1, p. 22-31, 2019.

HOHL, T.M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell*, Vol. 6, p. 1953–1963, 2007.

HOU, X.; et al. Clinical features and diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis in Chinese patients. *Medicine (Baltimore)*, Vol. 96, n. 42, p. e8315, 2017.

HOUBRAKEN, J.; de VRIES, R.P.; SAMSON, R.A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol*, Vol. 86, p.199-249, 2014.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; KOLAŘIK, M.; JURJEVIČ, Z.; PETERSON, S.W. Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. *Mycologia*, Vol. 107, p.169-208, 2015.

IZUMIKAWA, Ka.; OHTSU, Y.; KAWABATA, M.; TAKAYA, H.; MIYAMOTO, A.; SAKAMOTO, S.; et al. Clinical efficacy of micafungin for chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*, Vol. 45, p. 273–8, 2007.

IZUMIKAWA, Kb, YAMAMAOTO, Y.; MIHARA, T.; TAKAZONO, T.; MORINAGA, Y.; KUIRHARA, S.; et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*, Vol. 50, p. 811–7, 2012.

IWATA, H.; MIWA, T.; TAKAGI, K. [Pulmonary tuberculosis and mycotic infection--clinical and serological diagnosis]. *Kekkaku*, Vol. 64, p. 7-13, 1989.

JAESCHKE, R. Users' guides to the medical literature. JAMA, Vol. 271, p. 703-707, 1994.

JEONG, Y.J.; LEE K.S. Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management. AJR Am J Roentgenol, Vol. 191, p. 834-44, 2008.

JHUN, B.W.; JEON, K.; EOM, J.S.; LEE J.H.; SUH, G.Y.; KWON, O.J.; et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis. Med Mycol, Vol. 51, p. 811-817, 2013.

JUDE, C.M.; NAYAK, N.B.; PATEL, M.K.; DESHMUKH, M.; BATRA, P. Pulmonary coccidioidomycosis: pictorial review of chest radiographic and CT findings. Radiographics, Vol. 34, p. 912-25, 2014.

KALUA, K.; ZIMBA, B.; DENNING, D.W. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Malawi. J Fungi (Basel), Vol. 4, n. 2, p. 61, 2018.

KANJ, A.; ABDALLAH, N.; SOUBANI, A.O. The spectrum of pulmonary aspergillosis. Respiratory Medicine, 2018.

KAUFFMAN, H.F.; BEAUMONT, F.; MEWS, H.; van der HEIDE, S.; VRIES, K. Comparison of antibody measurements against *Aspergillus fumigatus* by means of double-diffusion and enzyme-linked immunosorbent assay (ELBA). J Allergy Clin Immunol, Vol. 72, p. 255-261, 1983.

KETATA, W.; REKIK, W.K.; AYADI, S.; KAMMOUN. Les tuberculosis extrapulmonaires. Rev Pneumol Clin, p. 1-10, 2014.

KHWAKHALI, U.S.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infections in Nepal. Mycoses, Vol. 58, n. 5, p. 45-50, 2015.

KITASATO, Y.; TAO, Y.; HOSHINO, T.; TACHIBANA, K.; INOSHIMA, N.; YOSHIDA, M.; et al. Comparison of *Aspergillus* galactomannan antigen testing with a new cut-off index and *Aspergillus* precipitating antibody testing for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. Respiriology, Vol. 14, p. 701-708, 2009.

KOHNO, S.; IZUMIKAWA, K.; OGAWA, K.; et al. Intravenous micafungin versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a multicenter trial in Japan. J Infect, Vol. 61, p. 410-418, 2010.

KOSMIDIS, C.; DENNING, D.W. 2015. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Thorax, Vol. 70, p. 270-277, 2015.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur Respir Rev, Vol 20, n. 121, p. 156-174, 2011.

KURHADE, A.M.; DESHMUKH, J.M.; FULE, R.P.; CHANDE, C.; AKULWAR, S. Mycological and serological study of pulmonary aspergillosis in central India. Indian J. Med. Microbiol, Vol. 20, p. 141-144, 2002.

KURUP, V.P.; RESNICK, A.; SCRIBNER, G.H.; KALBFLEISCH, J.H.; FINK, J.N. Comparison of antigens and serological methods in *Aspergillus fumigatus* antibody detection. *Mykosen*, Vol. 27, p. 43-50, 1984.

KWIZERA, R.; PARKES-RATAMSHI, R.; PAGE, I.D.; SEKAGGYA-WILTSHIRE, C.; MUSAAKI, J.; FEHR, J.; et al. Elevated *Aspergillus*-specific antibody levels among HIV infected Ugandans with pulmonary tuberculosis. Kwizera et al. *BMC Pulmonary Medicine*, Vol. 17, p. 149, 2017.

KWON-CHUNG, K.J.; SUGUI, J.A. *Aspergillus fumigatus*—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog*, Vol. 9, p. 1–4, 2013.

LAGROU, K.; MAERTENS, J.; VAN EVEN, E.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infections in Belgium. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 1-5, 2015.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, Vol. 33, n. 1, p. 159-74, 1977.

LARONE, D. Medically important fungi: a guide to identification. 5^a. Ed., ASM Press, American Society of microbiology, Washington DC, 2011.

LATGÉ, J.P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 33, n. 1, 2019.

LEE, M.R.; HUANG, H.L.; CHEN, L.C.; YANG, H.C.; KO, J.C.; CHENG, M.H.; et al. Seroprevalence of *Aspergillus* IgG and disease prevalence of chronic pulmonary aspergillosis in a country with intermediate burden of tuberculosis: a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*, Vol. 26, n. 8, p. 1091.e1-1091.e7, 2020.

LONGBOTTOM, J.L.; PEPYS, J. Pulmonary aspergillosis: diagnostic and immunological significance of antigens and C-substance in *Aspergillus fumigatus*. *J Pathol Bacteriol*, Vol. 88, p. 141-151, 1964.

LOWES, D, AL-SHAIR, K.; NEWTON, P.J.; et al. Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J*, Vol. 49, 2017.

McINNES, M.D.F.; MOHER, D.; THOMBS, B.D.; McGRATH, T.A.; BOSSUYT, P.M.; PRISMA-DTA Group. Preferred reporting items for a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies: The PRISMA-DTA Statement. *JAMA*, Vol. 319, p. 388-396, 2018.

MEAWED, T.E.; FAWZY, M.A.; EL GAMRY, R.M.; et al. Frequency of pulmonary fungal infection in Egyptian patients with re-treatment pulmonary tuberculosis and its clinical and radiological significance. *J Am Sci*, Vol. 8, p. 683–691, 2012.

MISHRA, S.K.; FALKENBERG, S.; MASIHI, N. Efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay in serodiagnosis of aspergillosis. *J Clin Microbiol*, Vol. 17, p. 708-710, 1983.

MOHAMMAD, K.; ISMAEL, H.M.; SHEKHANY, K.; AL-ATTRAQHCHI, A.A.F.; ABDULLAH, S.K.; ALDABBAGH, R.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infection in Iraq. Conference: ESCMID 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases At: Barcelona Volume: ECCMI-2416, April 2014.

MORTENSEN, K.L.; DENNING, D.W.; ARENDRUP, M.C. The burden of fungal disease in Denmark. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 15-21, 2015.

MULDOON, E.G.; SHARMAN, A.; PAGE, I.; BISHOP, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus* nodules; another presentation of chronic pulmonary aspergillosis. *BMC Pulm Med*, Vol. 16, p. 123, 2016.

MULDOON, E.G., STREK, M.E.; PATTERSON, K.C. Allergic and Noninvasive Infectious Pulmonary Aspergillosis Syndromes. *Clin Chest Med*, Vol. 38, n. 3, p. 521-534, 2017.

NAKIYINGI, L.; SSENGOOBA W.; NAKANJAKO, D.; ARMSTRONG, D.; HOLSHOUSER, M.; KIRENGA, B.J.; et al. Predictors and outcomes of mycobacteremia among HIV-infected smear-negative presumptive tuberculosis patients in Uganda. *BMC Infect Dis*, Vol. 15, p. 62, 2015.

OCANSEY, B.K.; PESEWU, G.A.; CODJOE, F.S.; OSEI-DJARBENG, S.; FEGLO, P.K.; DENNING, D.W. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Ghana. *J Fungi (Basel)*, Vol. 5, n. 2, p. 38, 2019.

OHBA H, MIWA S, SHIRAI M, KANAI M, EIFUKU T, SUDA T, HAYAKAWA H, CHIDA K. Clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonar aspergillosis. *Respiratory Medicine*, Vol. 106, p. 724-729, 2012.

OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infection in Nigeria. *West Afr J Med*, Vol. 32, n. 2, p. 107-14, 2014.

OLADELE, R.O, IRURHE, N.K.; FODEN, P.; AKANMU, A.S.; GBAJA-BIAMILA, T.; NWOSU, A.; et al. Chronic pulmonary aspergillosis as a cause of smear-negative TB and/or TB treatment failure in Nigerians. *Int J Tuberc Lung Dis*, Vol. 21, n. 9, p. 1056-1061, 2017.

OUT, A.; HASHMI, M.; MUKHTAR, A.M.; KWIZERA, A.; TIBERI, S. MACRAE, B.; ZUMLA, A.; DUNSER, M.W.; MER, M. The critically ill patient with tuberculosis in intensive care: Clinical presentations, management and infection control. *Jornal of Critical Care*, Vol. 45, p. 184-196, 2018.

OUCHTERLONY, D. Antigen-antibody reactions in gels: types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathol Microbiol Stand*, Vol. 32, n. 231, 1953.

OSAKI, S.; NAKANISHI, Y.; WATAYA, H.; et al. Prognosis of bronchial artery embolization in the management of hemoptysis. *Respiration*, Vol. 67, p. 412-6, 2000.

OSMANOV, A.; DENNING, D.W. Burden of serious fungal infections in Ukraine. *Mycoses*, Vol. 58, n. 5, p. 94-100, 2015.

ÖZENCI, V.; KLINGSPOR, L.; ULBERG, M.; CHRYSANTHOU, E.; DENNING, D.W.; KONDORI, N. Estimated burden of fungal infections in Sweden. *Mycoses*, Vol. 62, n. 11, p. 1043-1048, 2019.

PABST, S.; KRUGER, M.; SKOWASCH, D.; ZHOU, H.; BURMANN, J.; KAMINSKI, M. Pulmonary aspergillosis: therapeutic management and prognostic factors from 16 years of monocenter experience. *Adv Exp Med Biol*, Vol. 755, p. 225–36, 2013.

PAGE, I.D.; RICHARDSON, M.D.; DENNING, D.W. Comparison of six *Aspergillus*-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). *J Infect*, Vol. 72, p. 240-249, 2016.

PAGE, I.D.; RICHARDSON, M.D.; DENNING, D.W. Siemens Immulite *Aspergillus*-specific IgG assay for chronic pulmonary aspergillosis diagnosis. *Med Mycol*, Vol. 0, p. 1-8, 2018.

PAGE, I.D.; BYANYIMA R.; HOSMANE, S.; ONYACHI, N.; OPIRA, C.; RICHARDSON, M.; et al. Chronic pulmonary aspergillosis commonly complicates treated pulmonary tuberculosis with residual cavitation. *Eur Resp J*, Vol. 53, 2019.

PASSERA, E.; RIZZI, A.; ROBUSTELLINI, M.; ROSSI, G.; DELLA PONA, C.; MASSERA, F.; ROCCO, G. Pulmonary aspergilloma. Clinical aspects and surgical treatment outcome. *Thoracic. Surg. Clin*, p. 345–361, 2012.

PATTERSON, T.F.; THOMPSON, G.R.; DENNING D.W.; FISHMAN, J.A.; HADLEY, S.; HERBRECHT, R.; et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, Vol. 63, p. e1-e60, 2016.

PRICE, T.H.; BOECKH, M.; HARRISON, R.W.; McCULLOUGH, J.; NESS, P.M.; STRAUSS, R.G.; NICHOLS, W.G.; HAMZA, T.H.; CUSHING, M.M.; KING, K.E.; YOUNG, J.A.; WILLIAMS, E.; McFARLAND, J.; HOLTER-CHAKRABARTY, J.; SLOAN, S.R.; FRIEDMAN, D.; PAREKH, S.; SACHAIS, B.S.; KISS, J.E.; ASSMANN, S.F. Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone-treated donors in neutropenic patients with infection. *Blood*, Vol. 126, p. 2153–2161, 2015.

RANAIVOMANANA, P.; RABERAHONA, M.; RABARIOELINA, S.; BORELLA, Y.; MACHADO, A.; RANDRIA, M. J. D. D.; RAKOTOARIVELO, R. A.; RASOLOFO, V.; RAKOTOSAMIMANANA, N. Cytokine Biomarkers Associated with Human Extra-Pulmonary Tuberculosis Clinical Strains and Symptoms. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9, p. 275, Feb. 2018.

RAPER, K.B.; FINNELL, D.I. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Willians and Wilkins. 1965.

REGNARD, J.F.; ICARD, P.; NICOLOSI, M.; et al. Aspergilloma: a series of 89 surgical cases. *Ann Thorac Surg*, Vol. 69, p. 898–903, 2000.

ROBERTS, C.M.; CITRON, K.M.; STRICKLAND, B. Intrathoracic aspergilloma: role of CT in diagnosis and treatment. *Radiology*, Vol. 165, p. 123-128, 1987.

RODRÍGUEZ, N.B.; JUAN-GALÁN, J.L.S.; ANDREU, C.M.F.; YEAR, D.M.; PITA, M.B.; LANCHA, M.R.P.; MARTÍNEZ, R.E.V.; ZARAGOZÍ, M.T.I.; MACHÍN, G.F.M. Chronic Pulmonary Aspergillosis in Patients with Underlying Respiratory Disorders in Cuba - A Pilot Study. *Journal of Fungi*, Vol. 5, n. 18, 2018.

SACARLAL, J.; DENNING, D.W. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Mozambique. *J Fungi (Basel)*, Vol. 4, n. 3, p. 75, 2018.

SALZER, H.J.; CORNELLY, O.A. Awareness of predictors of mortality may help improve outcome in chronic pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J*, Vol. 49, 2017.

SAMBATAKOU, H.; DUPONT, B.; LODE, H.; et al. Voriconazole treatment for subacute invasive and chronic pulmonary aspergillosis. *Am J Med*, Vol. 119, p. e17–e24, 2006.

SARACENO, J.L.; PHELPS, D.T.; FERRO, T.J.; et al. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: approach to management. *Chest*, Vol. 112, p. 541-548, 1997.

SARFATI, J.; MONOD, M.; RECCO, P.; SULAHIAN, A.; PINEL, C.; CANDOLF, E.; et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Vol. 55, p. 279-291, 2006.

SEHGAL, I.S.; CHOUDHARY, H.; DHOORIA, S.; AGGARWAL, A.N.; GARG, M.; CHAKRABARTI, A.; et al. Diagnostic cut-off of *Aspergillus fumigatus*-specific IgG in the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, Vol. 61, p. 770-776, 2018.

SEHGAL, I.S.; DHOORIA, S.; CHOUDHARY, H.; AGGARWAL, A.N.; GARG, M.; CHAKRABARTI, A.; et al. Efficiency of *A. fumigatus*-specific IgG and galactomannan testing in the diagnosis of simple aspergilloma. *Mycoses*, p: 1-8, 2019.

SCHWEER, K.E.; BANGARD, C.; HEKMAT, K.; CORNELLY, O.A. Chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, Vol. 57, p. 257-270, 2014.

SHAHID, M.; MALIK, A.; BHARGAVA, R. Prevalence of aspergillosis in chronic lung diseases. *Indian J. Med. Microbiol*, Vol. 19, p. 201-205, 2001.

SHIN, B., et al., Serum galactomannan antigen test for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *J Infect*, Vol. 68, n. 5, p. 494-9, 2014.

SIVASANKARI, S.; SENTHAMARAI, S.; ANITHA, C.; et al. Prevalence of invasive aspergillosis among (PTB) patients in Kanchipuram, India. *J Clin Diagn Res*, Vol. 8, n. 3, p. 22–23, 2014.

STATHER, D.R.; TREMBLAY, A.; MACEACHERN, P.; et al. Bronchoscopic removal of a large intracavitary pulmonary aspergilloma. *Chest*, Vol. 143, p. 238–41, 2013.

STUCKY-HUNTER, E.; RICHARDSON, M.D.; DENNING, D.W. Evaluation of LDBio *Aspergillus* ICT Lateral Flow Assay for IgG and IgM Antibody Detection in Chronic Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*, Vol. 57, p. e00538-19, 2019.

TAKAZONO, T.; IZUMIKAWA, K. Recent advances in diagnosing chronic pulmonary aspergillosis. *Front Microbiol*, Vol. 9, p. 1810, 2018.

TASHIRO, M.; TAKAZONO, T.; SAIJO, T.; YAMAMOTO, K.; IMAMURA, Y.; MIYAZAKI, T.; KAKEYA, H.; ANDO, T.; OGAWA, K.; KISHI, K.; et al. Selection of Oral Antifungals for Initial Maintenance Therapy in Chronic Pulmonary Aspergillosis: A Longitudinal Analysis. *Clin. Infect. Dis*, 2019.

TUFA, T.B.; DENNING, D.W. The Burden of Fungal Infections in Ethiopia. *J Fungi (Basel)*, Vol. 5, n. 4, p. 109, 2019.

TURDUMAMBETOVA, G.K.; OSMANOV, A.; DENNING, D.W. The Burden of Serious Fungal Infections in Kyrgyzstan. *J Fungi (Basel)*, Vol. 5, n. 3, p. 66, 2019.

UFFREDI, M.L.; MANGIAPAN, G.; CADRANEL, J.; KAC, G. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Vol. 22, p. 457-462, 2003.

VAN DE VEERDONK, F.L.; GRESNIGT, M.S.; ROMANI, L.; NETEA, M.G.; LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol*, Vol. 15, p. 661– 674, 2017.

VAN TOORENENBERGEN, A.W. Between-laboratory quality control of automated analysis of IgG antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Vol. 74, p. 278–281, 2011.

VELAYUTHAN, D.; SAMUDI, C.; SINGH, H.K.L.; PENG, N.K.; SHANKER, E.M.; DENNING, D.W. Estimation of the Burden of Serious Human Fungal Infections in Malaysia Rukumani *J. Fungi*, Vol. 4, n. 38, p. 1-8, 2018.

VERMA, R.; PATIL, T.B.; LALLA R. Disseminated tuberculosis manifesting as pulmonary, meningeal and spinal tuberculosis in an immunocompetent patient. *BMJ Case Reports*, p. 1-3, 2012.

VOLPE-CHAVES, C.E.; OLIVEIRA, S.M.V.L.; VENTURINI, J.; GRANDE, A.J.; SYLVESTRE, T.F.; MENDES, R.P.; PANIAGO, A.M.M. Accuracy of serological tests for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, Vol. 15, n. 3, p. e0222738, 2020.

WALSH, T.J.; ANAISSIE, E.J.; DENNING, D.W.; HERBRECHT, R.; KONTOYIANNIS, D.P.; MARR, K.A.; et al. Infectious diseases Society of America. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, Vol. 46, p. 327e60, 2008.

WARD, G.W.; KOHLER, P.F. Counter-electrophoresis as a rapid method for the detection of *Aspergillus* precipitins in pulmonary disease. *Chest*, Vol. 63, p. 49S-51S, 1973.

WHITING, P.F.; RUTJES, A.W.; WESTWOOD, M.E.; MALLETT, S.; DEEKS, J.J.; REITSMA, J.B.; et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*, Vol. 155, p. 529-536, 2011.

WIESNER, D.L.; KLEIN, B.S. Lung epithelium: barrier immunity to inhaled fungi and driver of fungal-associated allergic asthma. *Curr Opin Microbiol*, Vol. 40, p. 8–13, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Definitions and reporting framework for tuberculosis-2013 revision (updated December 2014). WHO Publications, p.1-47, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis report 2015, 20th ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/191102>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis report. 2017. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

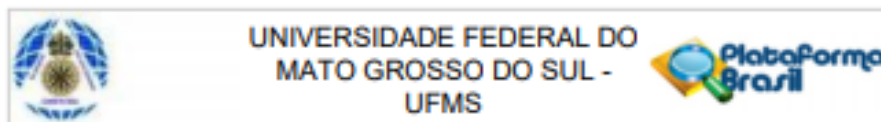
WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global tuberculosis report. 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: WHO; 2019.

YAMAMOTO, S.; TOIDA, I.; WADA, M.; HOSOJIMA, S.; KUDOU, S. Serological diagnosis of pulmonary aspergillosis by ELISA. *Kekkaku*, Vol. 64, p. 15-24, 1989.

YOU DEN W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, Vol. 3, p. 32-35, 1950.

ANEXO – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PREVALÊNCIA DE ASPERGILOMA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE

Pesquisador: CLÁUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56165616.9.0000.0021

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.840.731

Apresentação do Projeto:

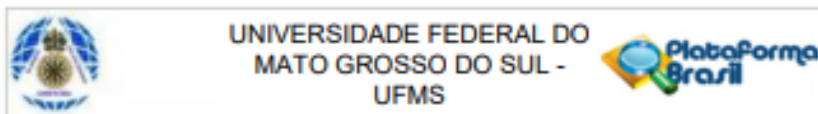
Estudo para avaliar a prevalência de aspergiloma pulmonar em pacientes com diagnóstico confirmado ou presuntivo de tuberculose pulmonar, acompanhados no ambulatório geral de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian – HUMAP.

Será dividido em duas etapas. A primeira será um estudo transversal onde serão selecionados 246 pacientes que completaram tratamento de tuberculose pulmonar nos últimos cinco anos para realização de exame micológico direto e cultura de escarro para pesquisa de *Aspergillus* spp, pesquisa de anticorpos séricos específicos anti-*Aspergillus* spp por meio dos testes de reação de imunodifusão dupla em gel de Agar (IDD) do teste imunoenzimático de ELISA específico para *Aspergillus* spp e tomografia computadorizada de tórax de alta resolução (TCAR). A segunda etapa será um estudo de coorte prospectivo que incluirá 73 pacientes admitidos com diagnóstico de tuberculose confirmado ou presuntivo e aqueles que já estão em tratamento.

Participarão do estudo indivíduos saudáveis doadores do Banco de Sangue do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, para que se possa calcular a especificidade do teste de ELISA para aspergilose, que será utilizada no cálculo da curva ROC.

Serão incluídos no estudo os pacientes com idade superior a 18 anos e que tenham recebido o

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.869.731

diagnóstico de tuberculose, confirmado ou presuntivo. Serão excluídos os pacientes que apresentarem doenças sistêmicas de etiologia infecciosa, parasitária, neoplásica ou inflamatória (conectivopatias) como comorbidade, gestantes e mulheres em fase de lactação

Serão usados dados primários como idade, sexo, profissão, procedência, cor e tempo de sintomas e forma clínica da tuberculose que serão obtidos por formulário de coleta. Também dados secundários como resultados de exames laboratoriais solicitados pelo médico assistente na rotina do atendimento dos doentes, tais como: hemograma, VHS, exames bioquímicos, teste tuberculínico, proteína c reativa.

Para o estudo transversal os pacientes que terminaram o tratamento para tuberculose pulmonar serão convidados a participar da pesquisa por acesso ao banco de dados do Hospital Dia – HUMAP e HRMS, para atendimento no ambulatório de Infectologia – HUMAP. Todos os exames realizados no HUMAP seguirão o fluxo da rotina hospitalar; no HRMS somente serão realizados exames conforme a indicação da rotina hospitalar.

O estudo será realizado em pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Ambulatório de Infectologia no Hospital Dia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP-UFMS) e no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS), no período de 16/10/2016 a 16/10/2020. Os pacientes serão avaliados no Ambulatório de Infectologia no Hospital Dia – HUMAP.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar a prevalência de aspergiloma pulmonar em pacientes com tuberculose pulmonar antes, no término e dois anos após o tratamento.

Específicos:

- Avaliar a sensibilidade do exame micológico direto e da cultura de escarro no diagnóstico de aspergiloma pulmonar.
- Avaliar a sensibilidade da pesquisa de anticorpos anti-Aspergillus spp pelo método de IDD.
- Avaliar a acurácia da pesquisa de anticorpos anti-Aspergillus spp pelo método de ELISA.
- Avaliar associações entre variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e tomográficas e a

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Protocolo: 1.840.731

presença de aspergiloma.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: desconforto do paciente no momento para a coleta de exames (picada de agulha), presença de hematomas

Benefícios: diagnóstico do Aspergiloma para encaminhamento rápido para tratamento com especialista.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta é relevante. Texto adequado a proposta apresentada, protocolo metodológico bem delineado e suficiente para atender aos objetivos propostos. Metodologia na segunda versão detalha sobre indivíduos saudáveis e qual o período e local para a realização das avaliações. Apresenta todos os instrumentos necessários a realização da pesquisa

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta:

- Anuência da chefe do serviço para utilização o banco de dados
- Anuência do chefe do setor de infectologia/NHU
- Anuência do chefe do setor de micologia/NHU
- Declaração de uso de material biológico e dados coletados assinada pela pesquisadora
- Termo de compromisso para utilização de informações de prontuários em projeto de pesquisa
- Instrumento de coleta de dados
- Declaração de Responsabilidade orçamentária da Pesquisadora
- Anuência do Comitê de Ética em Pesquisa do HRMS
- Termo de parceria com a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita – campus de Botucatu
- TCLE adequado à Resolução 466/2012
- anuência do Laboratório Central do Estado (LACEN).

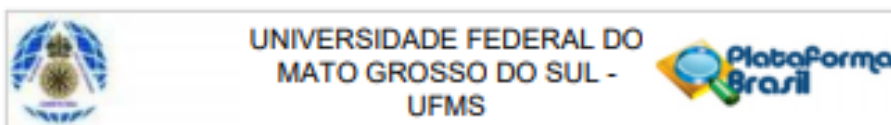
Recomendações:

* ajustar o cronograma do início do projeto, pois, estava previsto para 16/10/2016.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Apresenta todos os documentos necessários para a realização da pesquisa

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFMS
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: biosica@propp.ufms.br



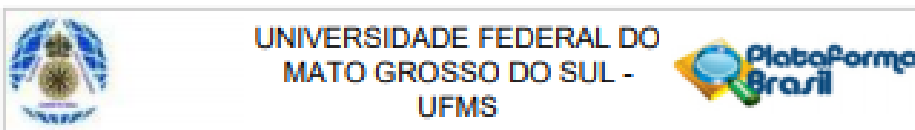
Continuação do Parecer: 1.840.731

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_710774.pdf	18/09/2016 16:19:29		Aceito
Outros	TUBERCULOSE_POP_HRMS_FLUXO.pdf	18/09/2016 16:16:43	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	POP_TUBERCULOSE_HU.pdf	18/09/2016 16:15:21	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	ANUENCIA_LACEN.pdf	18/09/2016 16:14:23	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_aspergiloma_cep_setembro.pdf	18/09/2016 16:13:24	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	Declaracao_de_Laboratorio.pdf	16/05/2016 21:36:31	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	ANUENCIA_CHEFIA_DE_SERVICO.pdf	16/05/2016 21:33:16	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	ANUENCIA_HRMS.PDF	16/05/2016 21:28:41	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	GEP.PDF	16/05/2016 21:26:22	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	CRONOGRAMA.pdf	15/05/2016 22:14:47	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	15/05/2016 22:14:07	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	ANUENCIA_BANCO_DE_DADOS.pdf	10/05/2016 19:57:39	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	TERMO_DE_PARCERIA_ATUALIZADO.pdf	10/05/2016 19:55:27	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto_aspergiloma_cep.docx	04/05/2016 23:30:56	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE	Aceito

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.840.731

Investigador	projeto_aspergiloma_cep.docx	04/05/2016 23:30:58	CHAVES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_utilizacao_de_prontuarios.pdf	04/05/2016 23:00:40	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	Declaracao_de_uso_de_material_biologico.pdf	04/05/2016 22:55:20	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Outros	INSTRUMENTO.pdf	04/05/2016 22:47:40	CLÁUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/05/2016 22:44:52	CLÁUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	04/05/2016 22:42:59	CLAUDIA ELIZABETH VOLPE CHAVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 29 de Novembro de 2016

Assinado por:

PAULO ROBERTO HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br