

Aspergilose pulmonar em pacientes de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa. Manaus, Amazonas

Matsuda J.S.^{1,2,5}, Wanke B.³, Assumpção I.A.⁶, Balieiro A.A.S.², Santos C.S.S.², Cavalcante R.C.S.⁴, Muniz M.M.³, Torres D.R.⁶, Martinez-Espinosa F.E.^{1,2}, Souza J.V.B.⁶.

¹- Pós-Graduação em Medicina Tropical - Universidade do Estado do Amazonas / Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas; ²- Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus, Amazonas; ³- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/INI), Rio de Janeiro, Brasil;

⁴-Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas; ⁵- Policlínica Cardoso Fontes-Secretaria Estadual de Saúde (SUSAM), Amazonas, Brasil;

⁶- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas.

E-mail: joyce@amazonia.fiocruz.br

Resumo

A aspergilose é a mais frequente das manifestações pulmonares das micoses, o agente causal são espécies patogênicas do gênero *Aspergillus*. Considerada doença oportunista, dependendo da integridade pulmonar e da árvore tráqueo-brônquica e do estado imunológico do hospedeiro. O *Aspergillus* ssp. pode comportar-se como agente sensibilizante, colonizador ou invasor. O objetivo desta pesquisa foi descrever os casos de aspergilose pulmonar diagnosticados na Policlínica Cardoso Fontes do Estado do Amazonas-Brasil, e analisar seus aspectos clínicos, laboratoriais e desfecho. Foi realizado um estudo observacional descritivo de dezembro de 2012 a novembro de 2014. Em pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar com exame de baciloscopia direta do escarro negativo, investigando aspergilose pulmonar. O material coletado por escarro induzido foi submetido ao exame de microscopia direta, cultivo para fungos. Adicionalmente, foi coletado soro para imunodiagnóstico de *Aspergillus fumigatus*. Trinta e seis pacientes foram diagnosticados com aspergilose pulmonar, sendo 20 (56%) do sexo masculino, a idade média foi de 48,6 anos. Todos pacientes tiveram tratamento prévio para tuberculose pulmonar. Os sintomas mais comuns foram tosse (100%, n = 36) e hemoptise (80%, n = 29), 22 (61%) apresentaram aspergiloma simples, enquanto os restantes 14 (39%) pacientes apresentaram aspergilose pulmonar cavitária crônica. Quatorze (39%) dos pacientes referiram tabagismo, que apresentou uma associação (p>0,01) com os pacientes que apresentaram forma mais grave. A presente pesquisa reforça a criação de um protocolo de acompanhamento clínico e laboratorial, em parceria com o programa de controle da tuberculose, com o objetivo de identificar a aspergilose pulmonar crônica precocemente.

Palavras-chave: Aspergilose pulmonar crônica, Aspergiloma pulmonar, Bola fúngica, TB negativa

Introdução

Micoses endêmicas têm emergido como um problema de saúde pública, mas todas elas têm sido negligenciadas e deveriam ser prioritárias para pesquisa na América Latina (1).

As manifestações pulmonares das micoses se apresentam com um amplo espectro de manifestações clínicas, desde infecção subclínica, tosse autolimitada até formas graves e letais (2).

A aspergilose é a mais frequente das manifestações pulmonares das micoses, representando um grupo diverso de infecções que em comum tem como agente causal espécies patogênicas termo tolerantes do gênero *Aspergillus*. Historicamente, *Aspergillus fumigatus* é o agente mais comum das várias formas de manifestações da aspergilose pulmonar, porém, atualmente observa-se um aumento progressivo de aspergilose causada por outras espécies, como *A. flavus*, *A. Níger*, *A. terreus*, entre outras (3). Considerada doença oportunista, dependendo da integridade pulmonar e da árvore tráqueo-brônquica e do estado imunológico do hospedeiro, espécies de *Aspergillus* podem comportar-se como agente: 1-sensibilizante, 2-colonizador ou 3-invasor, causando, respectivamente, os quadros clínicos de 1-aspergiloses alérgicas como a Aspergilose Bronco Pulmonar Alérgica (ABPA). 2.1-um simples aspergiloma ou aspergilose pulmonar intracavitária crônica, 2.2-fibrose pulmonar crônica por aspergilose ou 2.3-nódulo aspergilar (4), atingindo pessoas com lesões sequelares após uma outra doença pulmonar como a tuberculose, sarcoidose, pneumotórax etc. 3-Aspergilose invasiva, muitas vezes fatal, atinge pacientes gravemente imunocomprometidos, como em pessoas com neoplasias hematológicas (5).

Aspergillus spp. são fungos de distribuição universal na natureza, cuja porta de entrada é a via aérea, causando infecção humana após o contato direto com o meio ambiente com microfocos de agentes de micoses, cujos propágulos em suspensão aérea são inalados podendo atingir hospedeiros suscetíveis (6).

Em Boletim de 2012, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou a carga mundial da aspergilose pulmonar crônica em pacientes com sequela de tuberculose pulmonar (TB), especialmente em casos com cavitação pulmonar. Assim, para 7,7 milhões de casos de tuberculose pulmonar no mundo, foram estimados 372.000 de aspergilose pulmonar crônica, no período de um ano (7).

No Brasil, dos 70.789 casos novos de TB em 2011, a estimativa anual foi de 5.663 casos de aspergilose pulmonar crônica, com a taxa de 9,6 por 100.000 habitantes, com carga global substancialmente importante que requer uma investigação mais aprofundada nos países com alta carga de tuberculose. Os casos de aspergilose pulmonar crônica poderiam ser responsáveis por alguns tratamentos errôneos, como tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa, o que torna necessária e urgente uma melhor investigação para diagnosticar esta micose oportunista (8).

O objetivo deste estudo foi descrever os casos de aspergilose pulmonar diagnosticados na Policlínica Cardoso Fontes, referência Estadual em Pneumologia Sanitária no Estado do Amazonas-Brasil e analisar seus aspectos clínicos, laboratoriais e desfecho.

Material e métodos

Declaração de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (aprovação nº 2081 em 16/12/2011). O consentimento informado foi obtido sistematicamente, todos os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido de forma voluntária, após ser dada a todas as informações suficientes e necessárias. Todos os pacientes tiveram seus dados analisados anonimamente.

Foi realizado um estudo observacional descritivo de dezembro de 2012 a novembro de 2014.

O local do estudo foi na Policlínica Cardoso Fontes, na cidade de Manaus/AM, que é Referência Estadual em Pneumologia Sanitária, referenciada principalmente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), da rede Básica de Saúde, para tratamento e/ou esclarecimento diagnóstico de pneumopatias agudas ou crônicas. Anualmente são atendidos, em média, 8.000 pacientes nos ambulatórios da Policlínica. Este centro de referência é responsável por 60% dos diagnósticos dos casos novos de tuberculose (TB) em Manaus. Em 2014 a Policlínica notificou 300 casos novos de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa (SINAN-AM, acesso em 15/02/2015).

Em pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar com exame de baciloscopia direta do escarro negativo, foi investigado aspergilose pulmonar. Os prontuários de todos os pacientes foram revisados para coletar as características do paciente. O material coletado por escarro induzido foi submetido ao exame de microscopia direta e

cultivo para fungos. Adicionalmente, foi coletado soro para imunodiagnóstico de *Aspergillus fumigatus*, anti-HIV e realizada tomografia computadorizada do tórax.

O exame microscópico direto para pesquisa de fungos foi realizado na amostra do escarro ao microscópio, entre a lâmina e a lamínula, com KOH a 10% e Tinta Nanquim (9).

Os meios de cultivo utilizados foi Sabouraud-ágar 2% com cloranfenicol e actidiona, NSA (Niger Seed Agar), BHI (infusão de cérebro e coração), de 4 a 6 tubos de cada amostra, em temperatura de 25°C a 37°C, por um período de 4 a 6 semanas.

Realizamos sorologia por Imunodifusão Dupla em Gel de Agar (IDD) seguindo o protocolo descrito por Ouchterlony, 1962 (10). Esta prova se baseia na detecção de anticorpos específicos contra os agentes fúngicos especificados, com formação de imunocomplexos que, devido ao seu alto peso molecular, precipitam formando uma linha visível. Os antígenos utilizados foram antígenos filtrados de cultura de *Aspergillus fumigatus*, produzidos "in house" a partir da cepa JJG - seguindo o protocolo descrito por Coleman e Kaufman em 1972 (11).

A análise descritiva foi expressa como média \pm desvio padrão ou percentual, enquanto que a análise estatística foi realizada utilizando o qui-quadrado ou Fisher, o nível de significância foi de 5%.

Caso de Aspergilose pulmonar crônica (APC): Paciente com manifestações clínicas (sintomáticos respiratórios, com ou sem hemoptise), e radiológicas compatíveis, e exame sorológico positivo (12).

Resultados

De um total de 400 pacientes atendidos, 36 (9%) foram diagnosticados com aspergilose pulmonar na Policlínica Cardoso Fontes no período de dois anos, sendo 20 (56%) do sexo masculino, a idade média foi de 48,6 anos (variação de 16-80 anos). Todos tiveram história de tratamento prévio para tuberculose pulmonar.

Os sintomas mais comuns apresentando entre os 36 pacientes foram tosse (100%, n = 36) e hemoptise (80%, n = 29). Entre os 36 pacientes, 22 (61%) apresentaram aspergiloma simples ou bola fúngica (Grupo 1), enquanto os demais 14 (39%) apresentaram aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC) ou complexa,

Grupo 2 (Tabela 1). O tabagismo apresentou uma associação ($p=0,01$) com a forma mais grave, aspergilose complexa (Tabela 1).

Tabela 1 Características dos pacientes com Aspergilose Pulmonar Crônica diagnosticados na Policlínica Cardoso Fontes - Manaus/AM 2012-2014

	GRUPO 1 (N=22, 61%) Aspergiloma Simples	GRUPO 2 (N=14, 39%) Aspergilose Complexa	P VALUE X², Fisher <0,05
Idade	47,3 (16-80)	50,6 (19-77)	*
Gênero			
Masculino	12	8	0,5
Raça/Cor			
Branca	11	5	0,3
Tabagismo	5	9	0,01
Hemoptise	16	13	0,1
HIV**	1	1	*
Sorologia Positiva <i>Aspergillus fumigatus</i>	10	13	0,004
Bola Fúngica	21	9	0,02
Lesão Pulmonar Bilateral	4	12	>0,01

*Não atende ao pressuposto do teste. **HIV= Vírus da imunodeficiência humana.

Dos 36 pacientes da presente pesquisa, 02 (6%) apresentaram o exame anti-HIV reativo (Tabela 1). A sorologia por IDD resultou positiva em 23 (64%) dos pacientes, mais frequente ($p=0,004$) nos casos com APCC. Dezesesseis (44%) pacientes apresentaram lesão pulmonar bilateral, geralmente em associação ($p>0,01$) com a APCC, forma mais grave (Tabela 1).

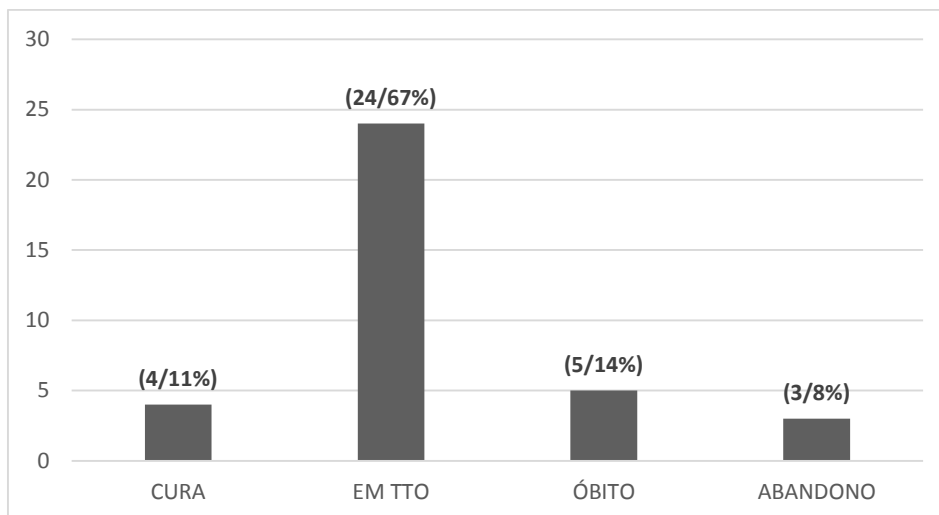


Gráfico 1- Desfecho dos casos de aspergilose pulmonar da Policlínica Cardoso Fontes Manaus/AM 2012-2014

Todos os pacientes iniciaram tratamento com Itraconazol 400mg/dia (13), sendo que três pacientes, posteriormente, fizeram a ressecção cirúrgica do aspergiloma, os demais pacientes não tinham indicação de tratamento cirúrgico ou se recusaram a realizar cirurgia.

Houve cura em quatro pacientes, três após ressecção cirurgia da bola fúngica pulmonar e apresentaram negatificação da sorologia por IDD, e um paciente após 1 ano de tratamento clínico. Dos cinco óbitos, um teve co-morbidade com neoplasia de estômago (Gráfico 1), os outros casos foram a óbito por problemas respiratórios graves e/ou hemoptise, como foi o caso de uma paciente com 19 anos, do gênero feminino, que realizou seu primeiro tratamento para TB com 14 anos, e posteriormente mais 3 tratamentos para TB, com diagnóstico de aspergilose pulmonar tardiamente a tomografia computadorizada do tórax revelou lesão bilateral com cavitação contendo material com densidade em partes moles (bola fúngica) (Figura 1), não apresentou outras co-morbidades, como diabetes ou HIV, foi à óbito.

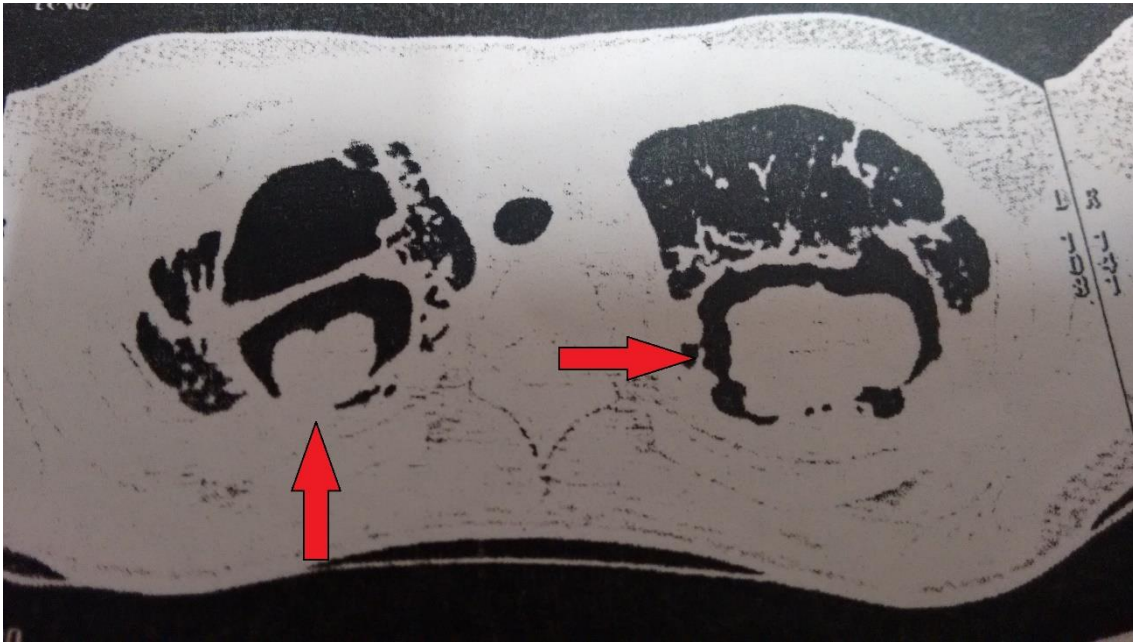


Figura 1- Aspergilose pulmonar cavitária crônica: corte tomográfico do pulmão revela lesão bilateral com cavitação contendo material com densidade em partes moles, bola fúngica (setas), com ar ao seu redor, formando o sinal do crescente aéreo. Paciente com 19 anos, 4 tratamentos anteriores para TB, óbito.

Discussão

Descrevemos 36 casos de aspergilose pulmonar diagnosticados em pacientes de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa na Policlínica Cardoso Fontes em Manaus/AM, no período de dois anos.

A aspergilose pulmonar, independentemente de uma associação com TB, ainda permanece negligenciada na Amazônia brasileira. Em regiões com alta prevalência de tuberculose, como o Estado do Amazonas, os casos de aspergilose pulmonar podem passar despercebidos porque as manifestações pulmonares frequentemente assemelham-se clínica e radiologicamente à tuberculose pulmonar crônica (14).

As formas crônicas de aspergilose pulmonar são pouco reconhecidas nos países em desenvolvimento, não só por causa da presença dominante da tuberculose, mas também devido à falta de consciência médica e à escassez de recursos laboratoriais para o seu diagnóstico de rotina. No Estado do Amazonas, a incidência de tuberculose em 2013 foi de 70,6 casos por 100.000 habitantes (SINAN), a maior do Brasil. A partir destes dados estima-se a ocorrência 192 novos casos de aspergilose por ano no estado do Amazonas. Infelizmente, a maioria destes pacientes é negligenciada ou são tratados repetida e empiricamente como TB (7).

Em todo o mundo ocorrem anualmente cerca de 9,6 milhões de casos novos e 1,5 milhões de mortes por TB. O tabagismo é um fator de risco independente causando cerca de um duplo aumento não só na tuberculose ativa, mas também na TB multirresistente (15, 16). No presente estudo, tabagismo apresentou uma associação de risco aumentado para ($p=0,01$) a forma APCC, forma mais grave da aspergilose pulmonar.

Os diagnósticos por imagem, em especial a radiologia, desempenham um papel importante no reconhecimento, tratamento e acompanhamento de enfermidades pulmonares (14). No presente estudo a presença de lesão cavitária bilateral estava associada aos casos de APCC (aspergilose complexa). Parau et al. (2011) observaram que, a forma cavitária crônica é encontrada em 55% dos casos de aspergilose e Luo et al. (2011) demonstraram que imagens de condensação na radiografia do tórax são encontradas em 76,5% desses pacientes. Imagens de condensação precedem cavitação e podem ser utilizadas como informação para diagnóstico precoce das infecções fúngicas pulmonares (17, 18).

A IDD é um teste simples e de fácil execução, de elevada sensibilidade e especificidade (de 80 a 95%) (19). Porém, o resultado é apenas qualitativo, indicando a necessidade de investigar mais acuradamente o agente quando a reação for positiva (9, 20). Outra limitação é que este teste é espécie-específico e indicativo apenas para *Aspergillus fumigatus* e atualmente observa-se um aumento progressivo de aspergilose causada por outras espécies, como *A. flavus*, *A. Níger*, *A. terreus*, entre outras (3). Importante ressaltar que o teste da IDD mostrou-se muito útil no acompanhamento do tratamento, negatizando em alguns meses após a cura, como foi observado no presente estudo, tornando-a exame de escolha para esta finalidade (19).

Conclusões / Recomendações

Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam a necessidade de criação e implementação de um protocolo de acompanhamento clínico e laboratorial, em parceria com o programa de controle da tuberculose, com o objetivo de identificar a aspergilose pulmonar crônica precocemente, principalmente nos pacientes de tuberculose pulmonar prévia, com baciloscopia do escarro negativa, imagem cavitária residual, lesão pulmonar bilateral, e/ou hemoptise.

Sugerimos que todos estes pacientes suspeitos se submetam a investigação continua, com exames micológicos de secreções respiratórias e a realização de sorologia IDD para detecção de anticorpos anti-*Aspergillus fumigatus*.

Agradecimentos

Estudo apresentado como parte da tese de doutorado de JSM do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas / Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Gostaríamos de agradecer a todos os funcionários da Policlínica Cardoso Fontes/AM/Brasil, pela colaboração e assistência na realização deste estudo.

Financiamento: Este trabalho foi apoiado por “Innovative approaches for tuberculosis control in Brazil”, number 1 U2R TW006883-09, Program ICOHRTA AIDS/TB, sponsored by Fogarty International Center/National Institutes of Health, USA.

FAPEAM Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, Edital • CHAMADA N.001/2013 – PPSUS, Nº Processo: 062.00649/2014. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta de dados e análise, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

Referências

Tirar números e citar as referências no texto do trabalho

1. Dujardin JC, Herrera S, do Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, Carrasco HJ, et al. Research priorities for neglected infectious diseases in Latin America and the Caribbean region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(10):e780.
2. Smith JA, Kauffman CA. Pulmonary fungal infections. *Respirology*. 2012;17(6):913-26.
3. Zanjani LS, Bakhtiari A, Sabokbar A, Khosravi AR, Bahonar A, Memarnejadian A. Sensibilisation of asthmatic patients to extracted antigens from strains of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *J Mycol Med*. 2012;22(1):58-63.
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(8):811-7.
5. Desoubeaux G, Bailly E, Chandenier J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. *Med Mal Infect*. 2014.
6. Volz PA. Transmission of fungal spores in space and their conditions for survival: a review. *Microbios*. 1997;91(368-369):145-51.
7. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*. 2012;89(12):864-72.
8. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ*. 2011;89(12):864-72.
9. Xavier MO, Oliveira Fde M, Severo LC. Chapter 1: laboratory diagnosis of pulmonary mycoses. *J Bras Pneumol*. 2009;35(9):907-19.

10. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. *Prog Allergy*. 1962;6:30-154.
11. Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *Appl Microbiol*. 1972;23(2):301-8.
12. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(3):545-61, vi.
13. Maturu VN, Agarwal R. Itraconazole in chronic pulmonary aspergillosis: In whom, for how long, and at what dose? *Lung India : official organ of Indian Chest Society*. 2015;32(4):309-
14. Ginzburg MA, Krut'ko VS, Rozhkova ER. [X-ray diagnosis of aspergillosis and its differential diagnosis from pulmonary tuberculosis]. *Vestnik rentgenologii i radiologii*. 1973;48(1):38-42.
15. Loddenkemper R, Bronnecke M, Castell S, Diel R. [Tuberculosis and Tobacco Smoking]. *Pneumologie*. 2016;70(1):17-22.
16. Marahatta SB, Adhikari B, Mishra SR, Raut S, Ramasoota P, Malla P, et al. Association of Previous Smoking Habit and Perceived Social Discrimination with the Risk of Multi-Drug Resistant Tuberculosis in Central Nepal. *Journal of Nepal Health Research Council*. 2015;13(29):95-101.
17. Parau A, Homorodean D, Jodal A, Cristina D. [Respiratory features of Aspergillus infection in eight years of pulmonology practice]. *Pneumologia*. 2011;59(4):204-7, 9-10.
18. Luo BL, Zhang LM, Hu CP, Xiong Z. Clinical analysis of 68 patients with pulmonary mycosis in China. *Multidiscip Respir Med*. 2011;6(5):278-83.
19. de Azevedo PZ, Sylvestre TF, Cavalcante Rde S, de Carvalho LR, Moris DV, de Oliveira ML, 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(8):e0134841.
20. Limper AH. The changing spectrum of fungal infections in pulmonary and critical care practice: clinical approach to diagnosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2010;7(3):163-8.