



**Projeto de Iniciação Científica:** Avaliação da detecção persistente de *Aspergillus fumigatus* a partir de espécimes clínicos pulmonares de pacientes com Fibrose Cística atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP

**Aluno:** Guilherme Leite Pigolli

**RA:** 173807

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Angélica Zaninelli Schreiber

**Vigência:** 01/08/2019 – 31/07/2020

## 1. Introdução

Fibrose cística (FC) é doença autossômica recessiva causada por mutações no genéticas em um conjunto de proteína na membrana citoplasmáticas. O acometimento pulmonar está presente em 90% dos pacientes, sendo que infecções crônicas associados à inflamação do parênquima pulmonar, com predomínio de neutrófilos, está relacionada a perda progressiva da função pulmonar, que é a grande responsável pela morbimortalidade em paciente com fibrose cística.

Para efeitos de terapia e prognóstico, é recomendado a avaliação da função pulmonar na rotina de cuidados do paciente portador de fibrose cística. O teste de função pulmonar é um modo de medir a gravidade da doença, o exame é chamado espirometria e avalia os seguintes parâmetros: CVC (capacidade vital forçada), VEF1 (Volume expiratório forçado no primeiro segundo), FEF máximo (fluxo expiratório máximo) e o FEF 25-75 ( Fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da capacidade vital). O VEF1 é o dado mais importante na análise, pois mostrou-se o preditor mais forte no desfecho clínico do paciente.

Atualmente sabe-se que a colonização crônica por *Pseudomonas aeruginosas* é um dos principais fatores associados a perda da função pulmonar, sendo estabelecida diversas práticas para impedir a colonização pelo patógeno, como uso de tobramicina inalatória e azitromicina via oral. Embora haja grande presença de isolados de *Aspergillus fumigatus* em na maioria dos pacientes, ainda não há consenso na literatura que a colonização pelo fungo leve a dano pulmonar e declínio sobre a função ao longo do tempo.

## 2. Objetivos

- Realizar uma análise objetiva do papel da colonização por *A. fumigatus* sensíveis ou resistentes aos antifúngicos, associados ou não a outras espécies

de *Aspergillus* ou bactérias, na história natural da doença e de sua relação com a função pulmonar antes e após a colonização dos pacientes portadores de fibrose cística.

- Correlacionar os dados obtidos com as respectivas condutas farmacológicas adotadas.

### **3. Materiais e métodos**

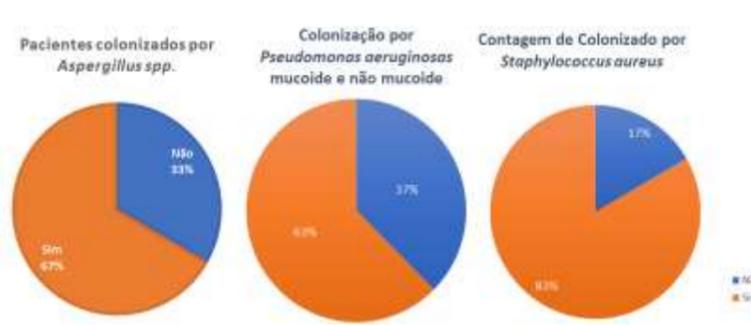
3.1 **Paciente e microrganismos:** foram resgatados 24 prontuários de pacientes portadores de fibrose cística atendidos pelo Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC – UNICAMP), cujos 198 isolados sequenciais de *Aspergillus fumigatus* estavam armazenados na Micoteca do Laboratório de Investigação em Fungos (LIF) do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas - FCM – UNICAMP.

3.2 **Identificação dos microrganismos:** São 198 isolados de *Aspergillus*. Através do sequenciamento do DNA, foi possível identificar as espécies: *A.fumigatus* (90,5%), *A.flavus* (6%), Complexo *A.terreus* (2%), e *A.alabamensis*, *A.lentulus* e *N.pseudofischeri* completando os restantes 1,5%.

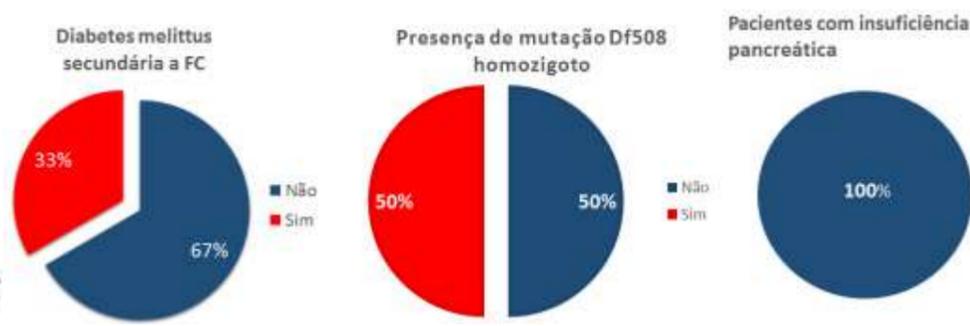
3.3 **Testes de suscetibilidade aos antifúngicos:** foram avaliados a concentração inibitória mínima (CIM) para anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol e concentração efetiva mínima (CEM) para caspofungina e micafungina. Os testes foram realizados de acordo com o documento documento M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008)

3.4 **Análise de prontuários:** idade, sexo, comorbidades (insuficiência pancreática, diabetes relacionada a fibrose cística, osteopenia, etc), colonização crônica por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, colonização por *Aspergillus fumigatus*, exacerbações infecciosas, uso de antibióticos inalatórios, imunomoduladores (azitromicina), teste genético, número de exacerbações, hospitalizações, dados de espirometria, uso de antifúngicos e exames complementares (tomografia de tórax, ultrassom de abdome). Um corte de, no mínimo, 5 anos foi realizado para a coleta de dados, portanto alguns pacientes tiveram seus dados levantados por 5 anos e outros por até 10 anos .Os dados foram analisados ano a ano, considerando o isolado ou não de *A. fumigatus*, a diminuição da função pulmonar pelos valores de espirometria e possíveis vieses como um maior ou menor número de exacerbações infecciosas pulmonares, uso correto de medicações para tratamento da doença de base e número de hospitalizações

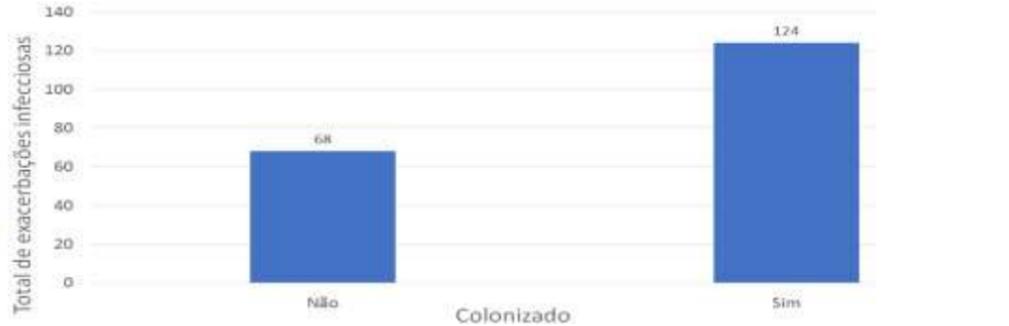
### **4. Resultados**



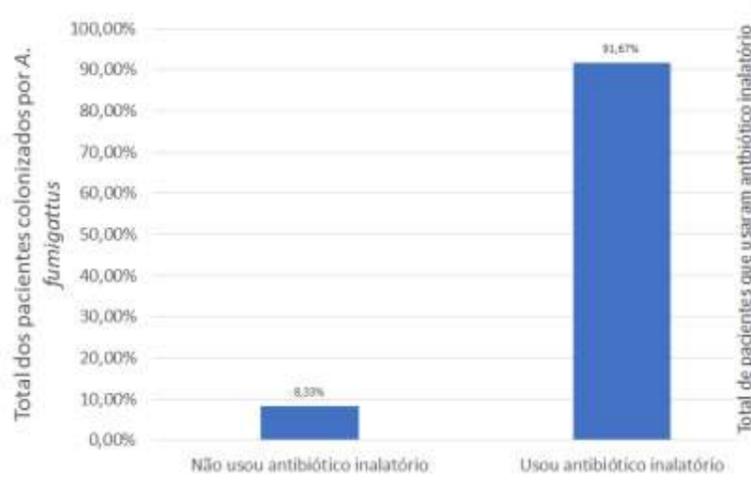
**Figura 1:** Do total de pacientes, 67% possuíam colonização crônica por *A. fumigatus*, 63% por *Pseudomonas aeruginosa* e 83% eram colonizados cronicamente por *Staphylococcus aureus*



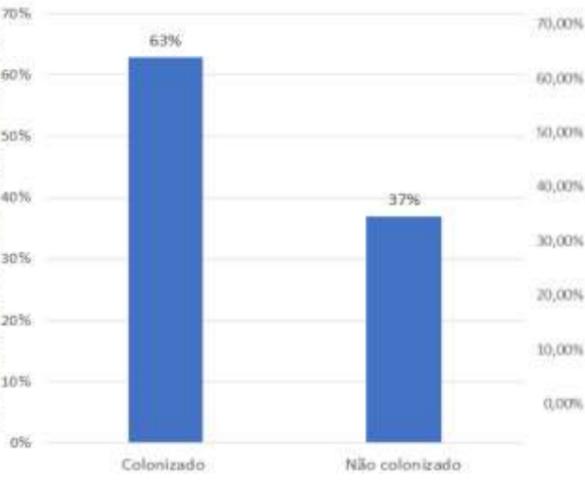
**Figura 2:** Comorbidades que afetam o prognóstico dos pacientes: 33% possuíam Diabetes mellitus secundária a fibrose cística; 50% eram homocigotos para a mutação Df508 e 100% possuíam insuficiência pancreática



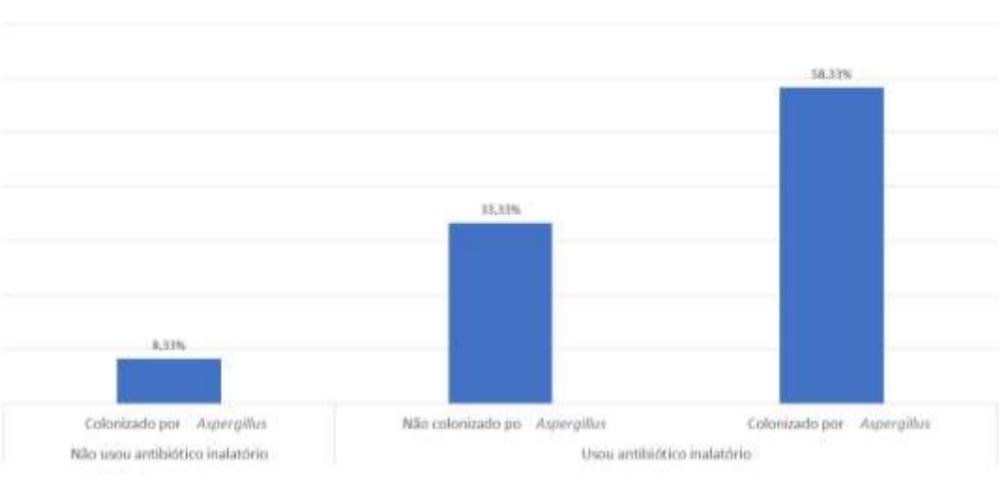
**Figura 3:** Relação entre colonização e exacerbação infecciosa. Nas ordenadas temos a soma de todas as exacerbações infecciosas (número absoluto) que foram divididos em dois grupos: pacientes com colonização crônica por *A. fumigatus* e aqueles não colonizados pelo fungo. Este gráfico não representa a colonização por outros patógenos.



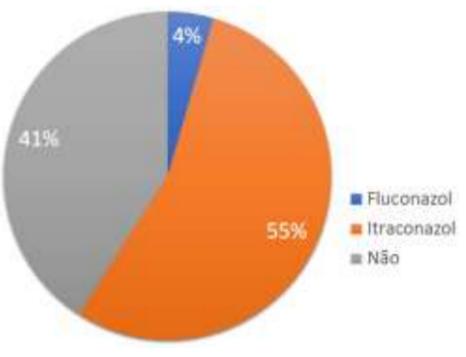
**Figura 4:** Relação entre uso de antibiótico inalatório e total de pacientes colonizados cronicamente por *A. fumigatus*. Neste gráfico podemos observar que 91,67% dos pacientes colonizados cronicamente por *A. fumigatus* usaram



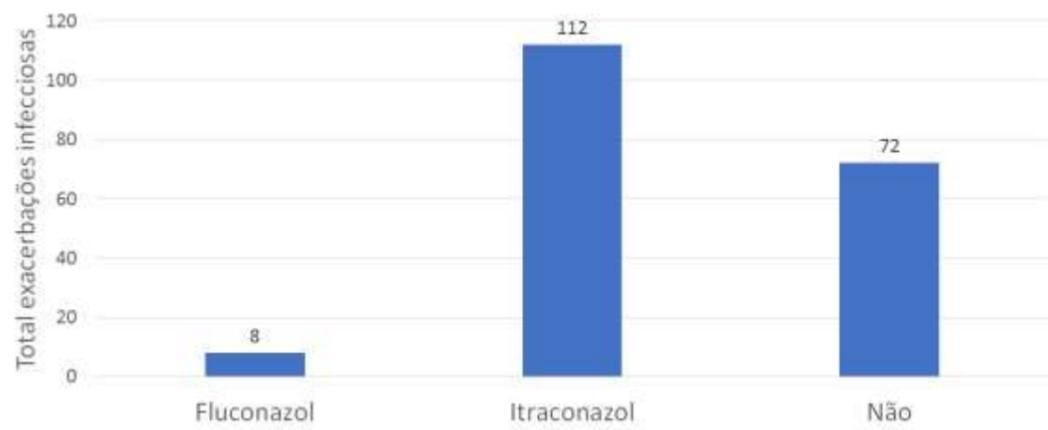
**Figura 5:** Relação entre uso de antibiótico inalatório e colonização por TPTRGM *A. fumigatus*



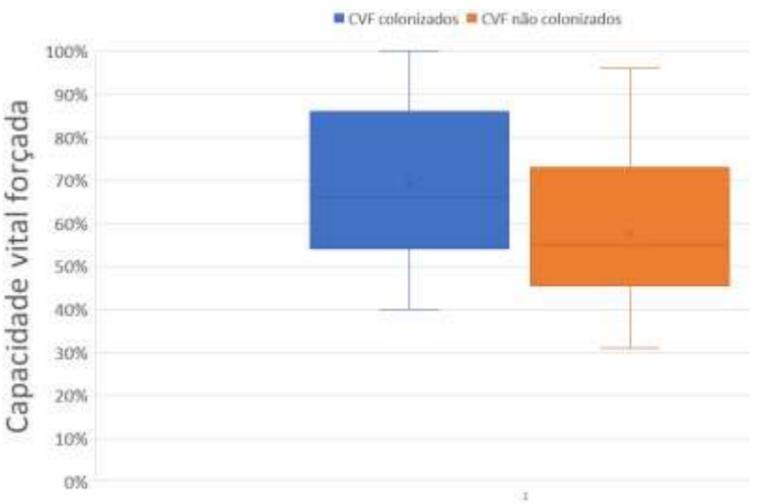
**Figura 6:** Relação entre total de pacientes estudados (n =25), uso de antibiótico inalatório e colonização crônica por *A.fumigatus*.



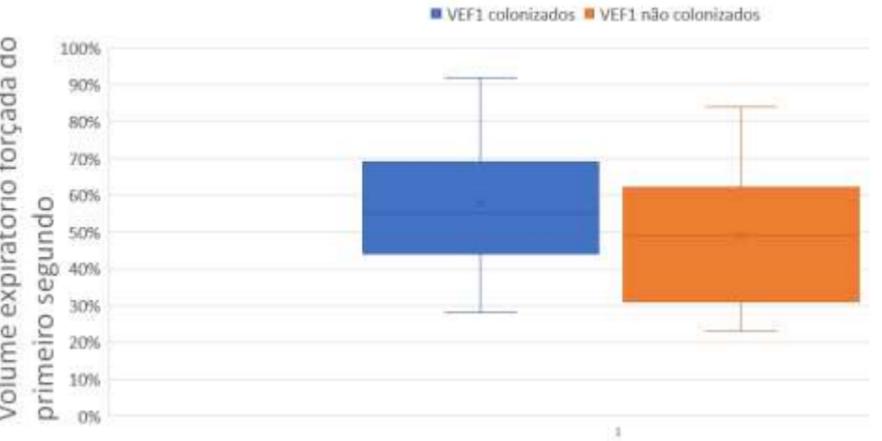
**Figura 7:** Uso de antifúngicos. Neste gráfico é possível visualizar a porcentagem em relação ao total de paciente estudados que utilizaram antifúngicos



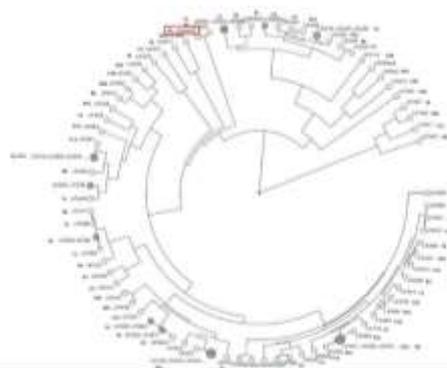
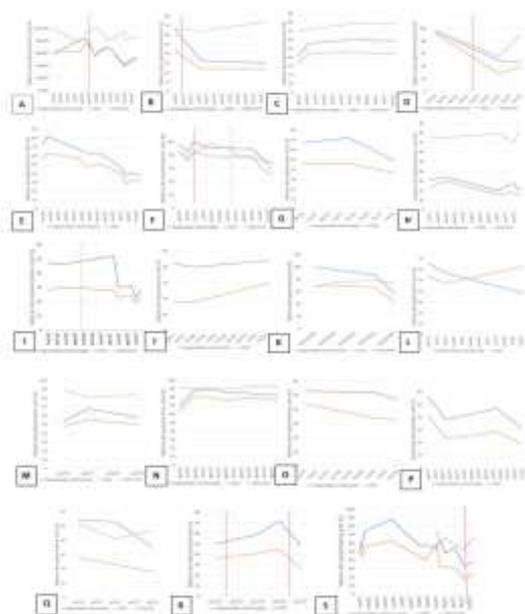
**Figura 8:** Soma de exacerbações infecciosas dividido em grupos de uso de fluconazol, uso de antifúngicos e não usou antifúngicos



**Figura 9:** Média da capacidade vital forçada em paciente colonizados cronicamente por *A.fumigatus* vs em não colonizados. CVF: Capacidade vital forçada.



**Figura 10:** Média do volume expiratório forçado do primeiro segundo em pacientes colonizados cronicamente por *A.fumigatus* vs em não colonizados. VEF1: Volume expiratório forçado do primeiro segundo.



**Figura 12:** Pacientes para os quais foi possível recuperar dados de espirometria: A: Paciente 2; B: Paciente 3; C: Paciente 5; D: Paciente 6; E: Paciente 7; F: Paciente 8; G: Paciente 9; H: Paciente 10; I: Paciente 12; J: Paciente 13; K: Paciente 13; L: Paciente 15; M: Paciente 16; N: Paciente 17; O: Paciente 18; P: Paciente 19; Q: Paciente 21; R: Paciente 22 e S: Paciente 23.

**Figura 13:** Análise genotípica dos microssatélites de 7 pacientes (107 isolados). Em destaque (vermelho), o isolado resistente do Paciente 06.

## 5. Discussão

A Pneumonia é a principal causa de mortalidade em pacientes com Fibrose Cística, sendo os principais responsáveis a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Staphylococcus aureus*, neste estudo há 63% e 83% de colonização, respectivamente, por esses patógenos (figura 1). Baseado em evidências o uso de antibióticos inalatórios e orais afetam mortalidade, sendo que 93% dos pacientes utilizaram tobramicina (figura 6). Outras comorbidades que afetam a mortalidade também foram analisadas, como visto na figura 2 (100% dos pacientes apresentavam insuficiência pancreática, 50% apresentavam homozigose para mutação no gene delta F508 e 33% apresentavam diabetes mellitus. Para avaliar o papel do *Aspergillus fumigatus* na perda da função pulmonar, foram analisados diversos vieses que também levam a perda da função pulmonar, tais como: colonização pelas bactérias supracitadas (figura 1),

número de exacerbações (figura 11), perfil genético (figura 13), uso de medicações (figuras 4,5 e 7), etc.

Foram possíveis visualizar diversas relações neste estudo: o uso de antibióticos inalatórios aumentou a colonização por *Aspergillus spp.*(figura 4 e figura 6). Aumento no número de exacerbações infecciosas em pacientes colonizados pelo fungo (figura 3). Uso de antifúngicos relacionado a pacientes com piora do quadro respiratório (figura 7). Não houve diferença entre da média simples da capacidade vital forçada e volume expiratório do grupo colonizado cronicamente e não colonizados (figuras 9 e 10). Entretanto, avaliando a evolução da função pulmonar de cada paciente separadamente (figura 12), podemos ver que o paciente 2, 6, e 22 apresentaram grande piora da função pulmonar durante ou após a colonização por *Aspergillus spp.*

Concomitantemente foi realizado análise de microssatélites (figura 13) dos 107 isolados de *Aspergillus fumigatus* em 7 pacientes analisados (pacientes 1,3, 6, 15, 20 e 24). A análise de microssatélites permite entender porque alguns isolados apresentam maior imunogenicidade, patogenicidade e resistência a antifúngicos, assim como permite rastrear a origem do isolado

## **6. Conclusão**

Não foi possível encontrar associação entre a colonização crônica por *Aspergillus spp.* e queda da função pulmonar. Há uma aparente relação entre a colonização crônica e uso de antibióticos inalatórios, assim como maiores taxas de exacerbações infecciosas. Este estudo não possui análises estatísticas