



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Mariana Rodrigues Trápaga

**ASPERGILOSE EM PACIENTES CRÍTICOS INTERNADOS EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA EM HOSPITAL TERCIÁRIO NO SUL DO BRASIL**

Rio Grande, 2023



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



**ASPERGILOSE EM PACIENTES CRÍTICOS INTERNADOS EM UNIDADE DE
TERAPIA INTENSIVA EM HOSPITAL TERCIÁRIO NO SUL DO BRASIL**

Mariana Rodrigues Trápaga

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Rio Grande,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Melissa Orzechowski Xavier
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Andrea von Groll

Rio Grande, 2023

Mariana Rodrigues Trápaga

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

ASPERGILOSE EM PACIENTES CRÍTICOS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA EM HOSPITAL TERCIÁRIO NO SUL DO BRASIL

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira (INI/FIOCRUZ) (Membro externo)

Prof^a. Dra. Cecília Bittencourt Severo (UFSCPA) (Membro externo)

Prof^a. Dra. Daniela Fernandes Ramos (FURG)

Prof^a. Dra. Rossana Patrícia Basso (FURG) (Suplente)

Orientadora: Prof^a. Dra. Melissa Orzechowski Xavier (FURG)

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Andrea von Groll (FURG)

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer a minha mãe, Rosane, e a minha avó Eneida, por todo apoio durante minha trajetória, e pela dedicação em me ajudar a chegar onde estou hoje.

Um agradecimento especial a minha orientadora Prof^a. Dra. Melissa, por ser um exemplo de líder, pesquisadora e pessoa. Agradeço imensamente por todo apoio, direcionamento e incentivo durante minha trajetória acadêmica, teu suporte foi essencial para cada passo dado no meu crescimento profissional (e pessoal) durante esse período. Teu amor pela pesquisa e pela Micologia me faz ter orgulho de poder crescer como pesquisadora com tua orientação! A minha co-orientadora Prof^a. Dra. Andrea, por ter aceitado essa parceria, e por ter agregado e compartilhado conhecimento essencial e inspirador, principalmente em Biologia Molecular, que fizeram com que esse trabalho fosse possível.

À Vanice, que além de ser uma inspiração como pesquisadora, cumpriu papel de orientadora, parceira de pesquisa (e de Índia) e amiga! À Lívia e a Aryse pelo “suporte molecular” e parceria. A Rossana e a Bianca pela ótima consultoria clínica. A Jéssica (Chica) pela empolgação contagiante. E a todo grupo do Laboratório de Micologia, Karine, Jéssica, Emília, Bruna, Leandre, Rejane, Fabiane, Taline, Lara, Abraão, e Anderson, cada um de vocês teve papel essencial durante esse período. Pesquisa nenhuma se faz sozinho, e ter a oportunidade de estar junto desse grupo que não mede esforços em ajudar, e que tem ótimas pessoas, tanto pessoal quanto profissionalmente, com certeza foi um dos maiores incentivos para seguir nessa jornada, agradeço imensamente a todos!

Agradeço aos colaboradores desse trabalho, que permitiram que ele fosse possível. E a banca examinadora por aceitar o convite, e agregarem seus conhecimentos para o enriquecimento do trabalho.

Agradeço as minhas amigas Isabel, Brenda, Isa e Paola, que sempre estiveram ao meu lado prontas para dar suporte quando necessário, tornando essa jornada mais leve. E ao Nikolas, meu parceiro de vida, é um prazer poder compartilhar contigo esse processo, teu suporte foi essencial, obrigada por tornar tudo mais fácil!

E por fim, agradeço a Universidade Federal do Rio Grande por oferecer um ensino público, gratuito e de qualidade.

Resumo

Nas últimas décadas, a relevância da aspergilose pulmonar invasiva (API) em pacientes críticos em unidade de terapia intensiva (UTI) tem sido demonstrada, culminando com agravamento do quadro clínico e maior taxa de mortalidade nas UTIs. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de API, destacam-se as infecções respiratórias virais graves, incluindo a covid-19. O diagnóstico da aspergilose é considerado um desafio, e com isso diferentes algoritmos clínicos/laboratoriais são propostos a partir de uma combinação de exames para confirmação diagnóstica. Associando a emergência da aspergilose no grupo de pacientes em UTI, com a não notificação obrigatória que resulta em uma falta de dados no Brasil, especialmente na região sul, há a necessidade urgente de avaliar a epidemiologia local em diferentes regiões do Brasil. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a prevalência, e avaliar dados clínico-epidemiológicos de pacientes com e sem covid-19 com aspergilose em UTI no Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr. (HU- FURG/EBSERH). Trata-se de estudo retrospectivo incluindo pacientes em ventilação mecânica entre janeiro de 2020 e agosto de 2022, cuja investigação de infecção fúngica foi realizada a partir de amostra respiratória e sérica. Foram coletados dados epidemiológicos (sexo e idade) desses pacientes, assim como dados clínicos (co- infecções, comorbidades, e variáveis hospitalares) em prontuário online. Além disso, foram coletados resultados dos exames micológicos realizados (cultivo de aspiradotraqueal, detecção de antígeno galactomanana em aspirado traqueal e soro) em banco de dados do Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), e prospectivamente foi realizado exame adicional de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para detecção de DNA de *Aspergillus* spp. nas amostras clínicas. Foram incluídos no total 87 pacientes, sendo 31 desses covid-19. Baseando-se nos algoritmos clínicos disponíveis para diagnóstico de API foram identificados 14 casos de aspergilose pulmonar associada a covid-19 provável (pCAPA) ($n=5$) ou de aspergilose pulmonar invasiva provável (pIPA) ($n=9$). A incidência geral de aspergilose na UTI foi de 78 casos a cada 1.000 hospitalizações, sendo que pCAPA e pIPA ocorrerem em 16% dos pacientes com (5/31) e sem covid-19 (9/56), respectivamente. Os resultados obtidos são pioneiros e evidenciam a importância da aspergilose em UTI em um hospital terciário do sul do Brasil, além de demonstrar a necessidade da melhoria do acesso aos exames laboratoriais de biomarcadores para um correto diagnóstico e condução dos casos.

Palavras-chave: diagnóstico micológico, aspergilose pulmonar associada a covid-19, algoritmo clínico, galactomanana, qPCR

Abstract

In recent decades, the relevance of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in critically ill patients in intensive care units (ICU) has been demonstrated, culminating in worsening of the clinical condition and a higher mortality rate in ICUs. Severe viral respiratory infections, especially Covid-19 and influenza, are among the risk factors for API development. The diagnosis of the disease is considered a challenge; therefore, different clinical/laboratory algorithms are proposed for the diagnosis of API, and all require a combination of different tests for diagnostic confirmation. Associating the emergence of aspergillosis in ICU patients with non-mandatory reporting that results in a lack of data in Brazil, especially in the southern region, there is an urgent need to assess the local epidemiology in different regions of Brazil. Thus, the objective of this study was to determine the prevalence and evaluate the clinical and epidemiological data of patients with and without Covid-19 and aspergillosis in the ICU at the Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr. (HU-FURG/EBSERH). This retrospective study included patients on mechanical ventilation between January 2020 and August 2022, whose investigation of fungal infection was performed using respiratory and serum samples. Epidemiological data (sex and age) were collected from these patients, and clinical data (co-infections, comorbidities, and hospital variables) were obtained from online medical records. In addition, the results of mycological tests (culture of tracheal aspirate, detection of galactomannan antigen in tracheal aspirate, and serum) were collected from the Mycology Laboratory of the Federal University of Rio Grande (FURG) database, and an additional test of real-time polymerase chain reaction (PCR) to detect *Aspergillus* spp. in clinical samples was performed prospectively. Based on available clinical algorithms for the diagnosis of IPA, 14 cases of putative Covid-19-associated pulmonary aspergillosis (pCAPA) (n=5) or probable invasive pulmonary aspergillosis (pIPA) (n=9) were identified. A total of 87 patients were included, 31 of whom had Covid-19. The overall incidence of aspergillosis in the ICU was 78 cases per 1,000 hospitalizations, with pCAPA and pIPA occurring in 16% of patients with (5/31) and without Covid-19 (9/56), respectively. In conclusion, to our knowledge, the results obtained are pioneering and show a high prevalence of aspergillosis in the ICU of a tertiary hospital in southern Brazil, in addition to demonstrating the need to improve access to diagnostic laboratory tests and raise the awareness of health professionals and the importance of the disease for the correct diagnosis and management of cases.

Keywords: mycological diagnosis, Covid-19 associated pulmonary aspergillosis, clinical algorithm, galactomannan, qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características macromorfológicas de colônias de diferentes seções de <i>Aspergillus</i> spp.; A: Secção <i>Flavi</i> , acima verso e abaixo reverso; B. Secção <i>Fumigati</i> , acima verso e abaixo reverso; C. Secção <i>Nigri</i> , acima verso e abaixo reverso.....	14
Figura 2: Esquema de estrutura micromorfológica do gênero <i>Aspergillus</i> spp.; (A) microscopia de um exemplar da secção <i>Fumigati</i> , (B) microscopia de um exemplar da secção <i>Flavi</i> , (C) Microscopia de um exemplar da secção <i>Nigri</i>	15
Figura 3: Manifestações clínicas da aspergilose pulmonar associada aos diferentes grupos de risco de pacientes. ABPA: aspergilose broncopulmonar alérgica.....	18

ARTIGO/MANUSCRITO 1

Figure 1: Flowchart used for the diagnosis of putative CAPA and probable IPA in ICU patients.....	34
Figure 2: Results of sections on <i>Aspergillus</i> spp. culture in the group with Covid-19 and non-Covid-19.....	36
Figure 3: Positivity on <i>Aspergillus</i> culture and biomarkers in combination in the group Covid-19 and non-Covid-19.....	36

APÊNDICE A

Figure 1. Organs of a thoroughbred foal with enterocolitis associated with systemic aspergillosis showing whitish nodules with a dense and friable cystic wall in the lungs (A), liver (B and C), and myocardium (D).....	66
Figure 2. Histopathology of the myocardium, frontal cortex of brain and lung tissues with hyaline septate-branching fungal hyphae stained with eosin hematoxylin.....	66
Figure 3: Hemorrhagic areas with necrosis, and dark disseminated nodules with a yellowish center, in lungs.....	67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO/MANUSCRITO 1

Table 1: Clinical-epidemiological data of patients, according to the group evaluated for CAPA or IPA.....	35
Table 2: Clinical-epidemiological and laboratorial data of patients diagnosed with putative “covid-19 associated with pulmonary aspergillosis”.....	38
Table 3: Critical ill patients diagnosed with probable aspergillosis.....	41
Table 4: Clinical-epidemiological data comparison between CAPA and non-CAPA group, and IPA and non-IPA group.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA – Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

APC – Aspergilose Pulmonar Crônica

API – Aspergilose Pulmonar Invasiva

CAPA – Aspergilose Pulmonar Associada a Covid-19

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimático

EV – Endovenoso

GM – Galactomanana

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IAPA – Aspergilose Pulmonar Associada a Influenza

Kg – Quilograma

LBA – Lavado Broncoalveolar

LFA – Ensaio de Fluxo Lateral

LFD – Dispositivo de Fluxo Lateral

Mg – Miligrama

pIPA – Provável Aspergilose Pulmonar Invasiva

pCAPA – Provável Covid-19 Associado a Aspergilose Pulmonar

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico

TC – Tomografia Computadorizada

UTI – Unidade De Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 <i>Aspergillus</i> spp.	13
2.1.1 Ciclo de Vida e Habitat	13
2.1.2 Morfologia	14
2.2 Aspergilose	15
2.2.1 Manifestações clínicas	16
2.3 Aspergilose Pulmonar Invasiva em Unidade de Terapia Intensiva.....	18
2.3.1 Fatores de Risco	19
2.3.1.1 Aspergilose Pulmonar Associada a Influenza	20
2.3.1.2 Aspergilose Pulmonar Associada a Covid-19.....	20
2.3.2 Diagnóstico	21
2.3.3 Definição de Aspergilose em UTI	24
2.3.4 Tratamento.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. ARTIGO-MANUSCRITO.....	30
5. CONCLUSÕES	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A	64

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* compreende fungos filamentosos, ubíquos e anemófilos, possuindo mais de 300 espécies descritas (FANG; LATGÉ, 2018; LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Esses fungos são agentes etiológicos da aspergilose, doença fúngica de grande importância para seres humanos. De fato, estima-se que essa micose acometa 15 milhões de pessoas no mundo e seja responsável por mais de um milhão de mortes por ano (GAFFI, 2018). As principais espécies patogênicas desse gênero estão dentro da seção *Fumigati*; e, em menor frequência, englobam as seções *Flavi*, *Nigri* e *Terrei* (SAMSON et al., 2014; SABINO, 2022).

A infecção ocorre pela inalação dos conídios de *Aspergillus* spp. e a doença acomete principalmente o trato respiratório inferior (KOSMIDIS; DENNING, 2015). *Aspergillus* spp. são fungos oportunistas e a manifestação da doença está diretamente relacionada a capacidade imunológica do hospedeiro, ou seja, esses fungos podem somente colonizar as vias áreas de indivíduos saudáveis, assim como são capazes de causar aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilose pulmonar crônica (APC), ou aspergilose invasiva (API) em hospedeiros com distintos fatores predisponentes (MARR; PATTERSON; DENNING, 2002; KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

A forma mais grave da doença, API, ocorre em pacientes com supressão imunológica, especialmente em casos de neutropenia prolongada, transplantados de células tronco hematopoiéticas e órgãos sólidos (SEGAL, 2009; BOCH et al., 2016). Porém a API não está restrita a apenas esses grupos de risco, na última década, tem-se demonstrado o alto impacto dessa doença em pacientes sem imunossupressão clássica que encontram-se em unidade de terapia intensiva (UTI), com aids ou com doença granulomatosa crônica em tratamento com corticosteroides, com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), ou com influenza ou covid-19 (VANDEWOUDE et al., 2004; MEERSSEMAN et al., 2007; VAN DE VEERDONK et al., 2017; TUDESQ et al., 2019; LAMOTH et al., 2020; NASIR et al., 2020).

Visando um melhor prognóstico desses pacientes é essencial o diagnóstico precoce e consequentemente tratamento adequado, porém, o diagnóstico da AI é um desafio. Com isso, a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC-MSG) estabeleceu critérios diagnósticos para essa doença, classificando-a como possível, provável e provada, dependendo da combinação entre fatores do hospedeiro, critérios micológicos e histopatológicos (DE PAUW et al., 2008). No entanto, esses critérios da EORTC-MSG são designados apenas para pacientes com câncer e/ou transplantados.

Para pacientes críticos, em UTI, são propostos algoritmos clínicos/laboratoriais, trazendo uma questão de ponderação de probabilidade para início de terapia antifúngica a partir

de quatro pilares, sendo esses (1) evidência micológica, (2) exames de imagem, (3) condições subjacentes, e (4) expressão aguda da doença. Blot et al. (2012) também classifica a identificação de *Aspergillus* spp. nesses pacientes como AI provada, AI provável e colonização por *Aspergillus* spp. Mais recentemente, critérios para classificação de AI em pacientes com influenza (IAPA) e pacientes covid-19 (CAPA) também foram propostos, dado sua diferença na apresentação da doença (KOEHLER et al., 2020; VERWEIJ et al., 2020; LAHMER et al., 2021).

Portanto, somando-se a importância da AI para pacientes em UTI no que tange a alta morbimortalidade, à falta de dados oriundos de diferentes centros hospitalares e realidades, incluindo a escassez de dados sobre API no extremo sul do Brasil, é necessário o desenvolvimento de estudos clínico-epidemiológicos em UTIs, principalmente abordando API no período pandêmico ocasionado pela covid-19, dado a importância da doença para pacientes com infecções virais de base.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aspergillus* spp.

Aspergillus spp. são fungos do filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e família Trichomaceae. O gênero foi catalogado pela primeira vez em 1729 pelo padre botânico italiano Pier Antonio Micheli na publicação ilustrada “*Nova Plantarum Genera Juxta Tournefortii Methodum Disposita (Florentiae)*”. Sua nomenclatura foi dada devido a semelhança da estrutura reprodutiva do fungo com o aspersório, em latim *aspergillum*, acessório utilizado para aspergir água benta. O gênero *Aspergillus* em 1965 abrangia 132 espécies descritas, divididas em 18 grupos de acordo com suas características morfológicas (RAPER; FENNEL, 1965). Em 1985, Gams et al. (1985) separou o gênero em sub-gêneros, os quais agrupavam-se em secções de acordo com características fenotípicas.

Atualmente, são aceitos e descritos seis subgêneros desses fungos (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Palypaecilum*), compreendendo 27 secções e 446 espécies (HUBKA et al., 2013; HOUBRAKEN; DE VRIES; SAMSON, 2014; HOUBRAKEN et al., 2020). As secções são complexos de espécies, as quais não são diferenciadas apenas por morfologia macro e microscópica, devido a isso são denominadas espécies crípticas (SAMSON et al., 2014), sendo apenas diferenciadas por métodos moleculares, utilizando um ou mais marcadores, tais como regiões da calmodulina e betatubulina (BALAJEE et al., 2009).

Dentro dos subgêneros, três são de importância clínica (*Fumigati*, *Circumdati* e *Nidulantes*) abrigando as principais secções com espécies patogênicas, sendo elas a *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, e com menor frequência *Terrei* (WALSH; GROLL, 2001). *Aspergillus* seção *Fumigati* possui espécies com grande impacto geral, pois são frequentemente associadas a infecções em humanos e animais, além de serem isolados como contaminantes de alimentos (LATGÉ; CHAMILOS, 2019). O *Aspergillus fumigatus sensu stricto* é o principal agente etiológico da aspergilose, devido a sua alta virulência, pelo tamanho reduzido dos conídios o que facilita a entrada no trato respiratório dos hospedeiros, a alta termotolerância, rápido crescimento, grande produção de gliotoxina e fumagilina, melanina e formação de biofilme (LATGÉ, 2001; FANG; LATGÉ, 2018).

2.1.1 Ciclo de Vida e Habitat

Aspergillus spp. são considerados anamórficos, ou seja, com reprodução assexuada predominante, sendo os conídios os propagadores fúngicos, que quando encontram substrato adequado desenvolvem célula vegetativa, dando origem ao conidióforo. Este, é composto pela vesícula que quando madura, produz as fiálides, as quais originam os conídios que dispersam-

se amplamente em diferentes ambientes (BENNETT, 2010). A forma sexuada de *Aspergillus* spp. (teleomorfo) ocorre raramente, havendo também a formação de célula vegetativa, onde se desenvolvem hifas “masculinas” e “femininas”, que quando em contato formam a hifa estéril. Esta, produz ascospóros que abrigam os ascos, os quais são liberados no ambiente e passam pelo mesmo processo de reprodução a partir da célula vegetativa (GEISER, 2009).

As espécies de *Aspergillus*, são consideradas ubíquas, ou seja, podem ser encontradas em diferentes ambientes tanto aéreo, aquáticos e terrestres. Isto ocorre principalmente pela alta capacidade de *Aspergillus* spp. de produzir enzimas, utilizando diferentes substratos orgânicos. Além disso, também está relacionada a sua ampla capacidade de produção de metabolitos primários e secundários, tais como ácido cítrico, ácido kójico, fumagilina, aflatoxina, gliotoxina, entre outros, que auxiliam na sua adaptação as diferentes condições ambientais (PARK et al., 2017). Essa capacidade possibilita que esse fungo esteja presente em plantas, solo, especialmente com matéria orgânica em decomposição, ar, ambientes aquáticos (marinhos, costeiros e de água doce), bem como em ambientes internos, como em casas e outras construções (SABINO et al., 2014).

2.1.2 Morfologia

As colônias de *Aspergillus* spp. tem crescimento rápido (2-5 dias), e texturas e cores variando de acordo com as seções. As texturas podem variar entre aveludada, algodonosa e pulverulenta. Já as cores do verso da colônia variam em um amplo espectro, incluindo camurça, verde, amarelo, verde-azulado, marrom e preto, enquanto o reverso apresenta sempre cores claras como branca, amarela ou acastanhada, considerando tratar-se de um fungo hialino (KLICH, 2002) (Figura 1).

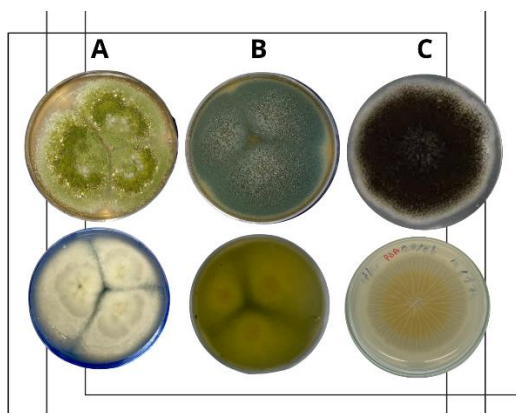


Figura 1: Características macromorfológicas de colônias de diferentes seções de *Aspergillus* spp.; A: Seção *Flavi*, acima verso e abaixo reverso; B: Seção *Fumigati*, acima verso e abaixo reverso; C: Seção *Nigri*, acima verso e abaixo reverso. Fonte: autores.

A principal característica microscópica do gênero é o conidióforo característico, originado a partir de uma célula-pé de hifas hialinas e septadas, a qual dilata-se em uma vesícula no ápice. Essa vesícula origina as fialídes que por sua vez produzem os conídios. Em algumas seções entre a fialíde e a vesícula há uma estrutura intermediária denominada métula (Figura 2). Os conídios desses fungos possuem tamanho reduzido (1 a 5 μm de diâmetro) e textura entre lisa a rugosa, variando entre as seções/espécies (SIDRIM & ROCHA, 2004).

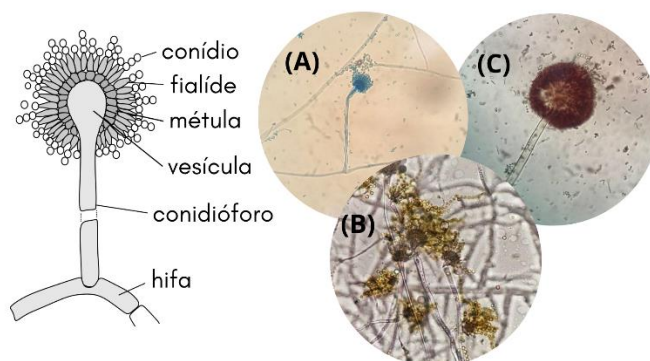


Figura 2: Esquema de estrutura micromorfológica do gênero *Aspergillus* spp.; (A) microscopia de um exemplar da secção *Fumigati*, (B) microscopia de um exemplar da secção *Flavi*, (C) Microscopia de um exemplar da secção *Nigri*. Fonte: autores.

A identificação a nível de espécie anteriormente era realizada a partir de chaves de identificação, observando as características fisiológicas e macro e micromorfológicas (HOUBRAKEN et al. 2014). Porém desde que foram agrupados nas secções, a diferenciação a nível de espécie é realizada por métodos moleculares de identificação, como sequenciamento, sendo utilizado o sequenciamento de genes como DNA ribossômico, calmodulina, β -tubulina (SAMSON et al. 2014).

2.2 Aspergilose

A aspergilose foi descrita pela primeira vez em 1842 por John Hughes Bennett, um médico que avaliou crescimento fúngico condizente com *Aspergillus* sp. em amostra clínica *post mortem* oriunda de paciente com acometimento pulmonar (pneumotórax). Sequencialmente outros casos da doença foram descritos, especialmente em pacientes que já apresentavam alteração pulmonar prévia, como as causadas por tuberculose (BENNETT, 1842; BARNES, 2004). Porém, na década de 1890 foram documentados os primeiros casos de aspergilose como doença primária (WAHL; ERICKSON, 1928). Entre 1930 e 1940 a atenção para a aspergilose começou a crescer, a partir do surgimento de pesquisas associando a relação dessa doença com reações alérgicas do sistema respiratório, e já evidenciando a preocupação

médica com a dificuldade do diagnóstico (FAWCITT, 1936). Na década de 1940 foi reconhecido que o fungo poderia vir a se tornar um patógeno grave, principalmente em pacientes com condição imunossupressora sistêmica ou pulmonar (GERSTL; WEIDMAN; NEWMANN, 1948). Nesse mesmo período foi observado que a aspergilose possuía diferentes manifestações clínicas as quais apresentavam diferentes grupos de risco (YESNER; HURWITZ, 1950).

Desde então, a aspergilose é considerada como uma das causas principais de mortalidade em pacientes gravemente imunocomprometidos, principalmente os neutropênicos, como aqueles que apresentam leucemia aguda, e os transplantados de células-tronco hematopoiéticas, sendo atribuído a esses uma taxa de mortalidade de até 50% associada a aspergilose (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018; LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Nas últimas décadas, tem se demonstrado novos grupos de pacientes em risco de desenvolver a aspergilose grave e que são não-neutropênicos, dentre esses estão os pacientes internados em UTI, que possuem alguma infecção respiratória viral grave, e os submetidos a tratamentos imunomodulatórios (STEVENS; MELIKIAN, 2011; TUDESQ et al., 2019).

Frente a importância da aspergilose, no que tange a morbimortalidade de pacientes, pela primeira vez, em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elencou a seção *Aspergillus fumigatus* como um patógeno crítico, dentre outros, que necessita de atenção para ações de saúde pública, pesquisas e investimentos (WHO, 2022).

2.2.1 Manifestações clínicas

A principal via de infecção para a aspergilose é a partir da inalação de conídios, ocorrendo maior acometimento do trato respiratório inferior. A progressão da infecção para o desencadeamento da doença está diretamente relacionada com o estado imunológico do hospedeiro (MARR; PATTERSON; DENNING, 2002; KOSMIDIS; DENNING, 2015). Um indivíduo hígido é capaz de eliminar os conídios de *Aspergillus* spp. inalados, não desenvolvendo doença.

Por outro lado, diferentes apresentações clínicas da doença ocorrem associadas as condições clínicas de base dos pacientes. A ABPA acomete principalmente indivíduos com asma e fibrose cística (PATEL; GREENBERGER, 2019). Nestes casos, a depuração mucociliar é deficiente nos pacientes possibilitando a germinação do conídio em hifas, induzindo reação de hipersensibilidade devido a liberação de antígenos (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013; KOSMIDIS; DENNING, 2015). A longo prazo, essa manifestação clínica leva a um quadro de asma mal controlada, gerando infiltrados pulmonares recorrentes,

e em alguns casos o desenvolvimento de bronquiectasia (AGARWAL et al. 2013).

Já, a APC está principalmente associada a indivíduos que apresentam alteração prévia de parênquima pulmonar, tais como pacientes com sequela de tuberculose, DPOC, câncer de pulmão previamente tratado, bronquiectasia ou pneumotórax (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018; TRAPAGA et al. 2022). A infecção por *Aspergillus* spp. nesse grupo de pacientes destrói gradualmente o tecido pulmonar, podendo levar a expansão das cavidades pulmonares (SMITH; DENNING, 2011). Em caso de pacientes que já possuem previamente cavidade pulmonar pode ocorrer o desenvolvimento de aspergiloma, ou bola fúngica, manifestação tardia da APC, definido como uma massa de hifas protegidas por uma matriz de fibrina e detritos celulares (DENNING et al., 2016; BONGOMIN et al., 2020).

A forma invasiva da aspergilose ocorre em pacientes que apresentam supressão imunológica, especialmente aqueles com neutropenia, transplantados de células tronco hematopoiéticas e órgãos sólidos, doença granulomatosa crônica ou em tratamento com imunossupresores (KOSMIDIS; DENNING, 2015; DE PAUW et al., 2008; SEGAL, 2009). Embora estes sejam os principais grupos de risco para API, na última década, tem-se demonstrado o alto impacto dessa doença em pacientes sem imunossupressão clássica que encontram-se em UTI, em tratamento com corticosteroides, com DPOC, ou infecções respiratórias virais graves, como influenza e covid-19 (VANDEWOUDE et al., 2004; MEERSSEMAN et al., 2007; VAN DE VEERDONK et al., 2017; TUDESQ et al., 2019; LAMOTH et al., 2020; NASIR et al., 2020). A API é caracterizada pela germinação dos conídios em hifas no tecido pulmonar, com invasão tecidual e vascular, causando áreas de hemorragia e isquemia nesse órgão (KANJ; ABDALLAH; SOUBANI, 2018).

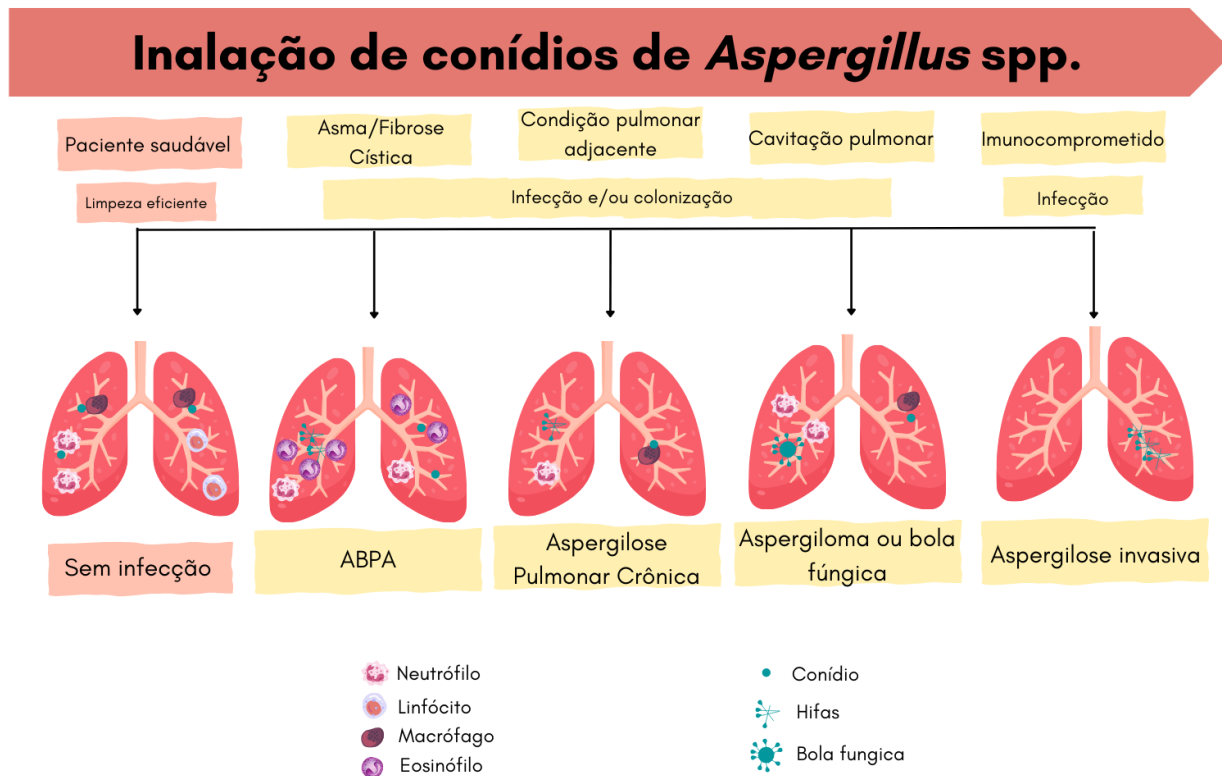


Figura 3: Manifestações clínicas da aspergilose pulmonar associada aos diferentes grupos de risco de pacientes. ABPA: aspergilose broncopulmonar alérgica. Adaptado de van de Veerdonk et al. (2017b).

2.3 Aspergilose Pulmonar Invasiva em Unidade de Terapia Intensiva

A API é uma micose emergente, de alto custo e com alto potencial de mortalidade em pacientes em UTI mesmo sem uma neutropenia clássica (MEERSSEMAN et al., 2004, 2007; BADDLEY et al., 2013; TACCONE et al., 2015; TEJERINA et al., 2019). Taxas de prevalência de API em UTIs variando de 0,2 a 36%, e mortalidade associada variando de 30 até >80% tem sido descritas em distintas regiões do mundo (MEERSSEMAN et al., 2004; BASSETTI et al., 2010; BADDLEY et al., 2013; TACCONE et al., 2015; LOUGHLIN et al., 2020; DABAS; MOHAN; XESS, 2021).

Um estudo retrospectivo realizado na Bélgica demonstrou que entre 1.850 internações na UTI, 6,9% dos pacientes foram diagnosticados com aspergilose, e desses 70% não possuíam malignidade hematológica (MESERMAN et al., 2004). Outro estudo realizado na Itália relatou retrospectivamente que a prevalência de API na UTI foi de 0,2%, não sendo uma pauta de

preocupação no centro (BASSETI et al; 2010). Junto a isso, em 2013, um estudo realizado retrospectivamente nos Estados Unidos demonstrou que de 6.424 pacientes, 6.4% foram identificados com API em UTI (BADDLEY et al.; 2013). Em 2015, um estudo multicêntrico internacional que incluía países da Europa e Índia avaliou pacientes em UTI com cultura positiva para *Aspergillus* spp., e desses 36% foram considerados com aspergilose provável, e 17% provada, com mortalidade de 67 e 79% nos grupos, respectivamente (TACCONE et al.; 2015). E mais recentemente, em 2020, foi realizado um estudo retrospectivo no Reino Unido, o qual evidenciou em pacientes em ventilação mecânica a presença de aspergilose em 12,4% (24/194) dos pacientes (LOUGHLIN et al.; 2020).

Enquanto isso, no Brasil não existem dados oficiais quanto a prevalência da aspergilose em UTI, e há escassez de estudos científicos que relatem a incidência de API em unidade de terapia intensiva não relacionado aos grupos de riscos clássicos. Estudo abrangendo pacientes DPOC em UTI demonstra prevalência de aspergilose de 4,2% (AQUINO et al. 2012). E, adicionalmente, um estudo realizado em 2015 estimou a frequência de pacientes acometidos com aspergilose pulmonar invasiva no Brasil em diferentes grupos de risco, baseado nas estimativas disponíveis na literatura científica e taxas de incidência global, sugerindo que a aspergilose invasiva acometa cerca de 8.700 pacientes no país, sendo cerca de 1.900 desses pacientes críticos (GIACOMAZZI et al. 2015).

2.3.1 Fatores de Risco

Fatores de risco para API em pacientes críticos internados em UTI, incluem além dos fatores de terapias de suporte, como suporte ventilatório, uso de antibióticos de amplo espectro, e inserção de cateter venoso central (LOUGHLIN et al., 2020; MEERSSEMAN et al., 2007; VANDEWOUDE et al., 2004), o uso de corticosteroides por tempo prolongado, câncer, transplante de órgão sólido, tratamento com imunossupressores, distúrbios respiratórios crônicos como DPOC, pneumonias, e bronquiectasias (GARNACHO-MONTERO et al., 2005; DE PAUW et al., 2008; DELSUC et al., 2015). A alteração na estrutura pulmonar e possível resposta imunológica prejudicada, juntamente com a depuração mucociliar do sistema respiratório reduzida, facilita a infecção por *Aspergillus* spp. (BASSETTI; BOUZA, 2017). Em adição, doenças subjacentes como HIV, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças renais e hepáticas também estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de aspergilose em UTI, bem como graves infecções virais como a covid-19 (KOEHLER et al., 2019; VERWEIJ et al., 2020; DELLIERE et al., 2021).

2.3.1.1 Aspergilose Pulmonar Associada a Influenza

Em casos graves de infecção viral, o vírus da influenza se replica primeiramente no epitélio das vias respiratórias dos pacientes, acarretando em processo inflamatório e consequentemente em comprometimento pulmonar. A IAPA ocorre principalmente pelo dano ao epitélio respiratório já causado durante a infecção viral, que predispõem o hospedeiro a infecção fúngica, nesses casos os conídios de *Aspergillus* spp. nesse epitélio lesionado desenvolvem-se em hifas e invadem o tecido, agravando o dano pulmonar e contribuindo para a progressão da doença para forma grave (VERWEIJ et al., 2020).

Pacientes com influenza que necessitam de internação em UTI, ou seja, que desenvolvem formas severas da doença, variam de acordo com a região geográfica, e com a taxa de vacinação do local, porém há uma estimativa que aproximadamente 0.1% dos pacientes necessitam de cuidados hospitalares, e desses 5-10% necessitam de internação em UTI (METERSKY et al., 2012; KALIL; THOMAS, 2019). A mortalidade associada a influenza no mundo varia de 250.000-500.000 mortes por ano, e essa alta mortalidade pode estar associada a infecção viral severa isolada ou a presença de outras co-infecções pulmonares, tais como tuberculose, outras pneumonias bacterianas, e aspergilose (MARTIN-LOECHES et al., 2017). De fato, a API apresenta importância elevada para esse grupo de pacientes em UTI, ocorrendo em cerca de 20-25% dos pacientes internados com influenza grave, com taxa de mortalidade superior a 50% (WAUTERS et al., 2012; VAN DE VEERDONK et al., 2017a; VERWEIJ et al., 2020).

2.3.1.2 Aspergilose Pulmonar Associada a Covid-19

A pandemia da covid-19, que emergiu na cidade de Wuhan na China em 2019 e rapidamente se espalhou globalmente, apresentou-se como forma grave em aproximadamente 5% dos infectados, tornando-os pacientes críticos com necessidade de cuidados intensivos (ZHOU et al., 2020). Nesses casos, os pacientes desenvolvem uma síndrome respiratória aguda grave, sendo manejados para UTI e necessitando de ventilação mecânica (WU; MCGOOGAN, 2020; ZHOU et al., 2020).

Além do dano significativo ao epitélio pulmonar, pacientes com covid-19 grave apresentam disfunção da resposta imune, como linfopenia e são frequentemente submetidos a terapias com antibióticos de amplo espectro e imunossupressoras (ZHOU et al., 2020). Dado isso, as infecções pulmonares secundárias associadas ao covid-19 começaram a ser reconhecidas nos pacientes hospitalizados, principalmente associadas ao uso de ventilação mecânica (BASSETTI; KOLLEF; TIMSIT, 2020; CHONG et al., 2021). Uma dessas que

recebe destaque é a CAPA. A infecção pulmonar por *Aspergillus* spp. nesses pacientes, agrava o dano ao tecido pulmonar, e predispõe a insuficiência respiratória e piora da função imunológica, acarretando em uma progressão mais rápida da doença (ARASTEHFAR et al., 2020; MARR et al., 2021). Estudos ao redor do mundo demonstram que a CAPA ocorre em 18 a 39% dos pacientes com covid-19, e tem uma taxa de mortalidade superior a 50% nesses pacientes (ALANIO et al., 2020; GANGNEUX et al., 2020; KOEHLER et al., 2020; NASIR et al., 2020).

Em hospital quaternário no estado de São Paulo no Brasil, a CAPA foi evidenciada em 0.4% (31/6.746) dos pacientes internados com covid-19 grave (CRUZ; MAGRI, 2020). No Amazonas foi realizado um estudo de autópsia de 50 casos de covid-19, sendo a CAPA evidenciada em 4% dos casos com comprovação de invasão tecidual (FARIAS et al., 2022). Já, em outro estudo retrospectivo realizado em um hospital de referência em São Paulo, a prevalência de CAPA nos pacientes internados em UTI foi de 16% (14/87), com mortalidade de 71,4% (ALMEIDA et al. 2021).

2.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico da API pode ser considerado um desafio pela dificuldade de interpretação dos resultados, principalmente associada à ubiquidade do fungo, e a possibilidade de colonização de vias aéreas (CADENA; THOMPSON; PATTERSON, 2016; LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Vários testes diagnósticos podem ser realizados para confirmação de casos de aspergilose, incluindo histopatologia, exame micológico direto, cultivo, imunoensaios para detecção de antígeno ou anticorpo e detecção de DNA por reação em cadeia da polimerase.

A histopatologia com evidência de invasão tecidual de hifas estreitas septadas (3-12 µm de largura), hialinas e ramificadas em ângulo agudo de 45°, sugestivas de *Aspergillus* spp. no tecido pulmonar é considerado o “padrão ouro” para o diagnóstico de aspergilose provada (MCCLENY, 2005; GUARNER; BRANDT, 2011). Porém, a definição patognomônica da doença se dá quando há cabeça das vesículas do fungo nesses exames, mas esse achado é de rara ocorrência no tecido, sendo associado principalmente a lesões pulmonares cavitárias (LANZARIN et al., 2015).

O exame micológico direto em amostras respiratórias é indicativo de aspergilose em caso de presença de hifas septadas e hialinas bifurcadas em ângulo agudo (GUARNER; BRANDT, 2011). A visualização de hifas determina com alta especificidade a presença de infecção por fungo filamentoso hialino nas vias aéreas, porém não é patognômico para *Aspergillus* spp. e possui baixa sensibilidade. O cultivo de amostras respiratórias possui

sensibilidade diagnóstica que varia de 30 a 60%, e é realizado a partir da semeadura das amostras clínicas em meio de cultivo para fungos, sendo observado o crescimento de espécies de *Aspergillus* entre 2 a 5 dias de incubação à 25°C (GUARNER; BRANDT, 2011; SCHELENZ et al., 2015). Nesses casos, o crescimento de *Aspergillus* spp. pode indicar colonização, doença ou até mesmo contaminação da amostra (durante a coleta ou no processamento), não sendo um marcador diagnóstico específico, porém, esse exame é um indicativo para o início de uma busca direcionada para *Aspergillus* spp., utilizando métodos diagnósticos complementares (CONTOU et al., 2016; HAGE et al., 2019).

Testes sorológicos que detectam anticorpos, como ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) e imunodifusão radial dupla em gel de ágar, são disponibilizados para o diagnóstico de aspergilose pulmonar, principalmente crônica. Porém, a busca por anticorpos em casos suspeitos de API não é indicada como primeira opção, devido a frequência de não formação de resposta imunológica robusta em pacientes dos grupos de risco para desenvolvimento dessa condição, o que limita a quantidade de anticorpos circulantes para detecção. Sendo preferencialmente utilizados para pacientes com suspeita de API, testes para a detecção de antígenos circulantes de *Aspergillus* spp.. (LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

Nessa linha, o principal biomarcador antigênico é a galactomanana (GM), um polissacarídeo presente na parede celular de *Aspergillus* spp., que é liberado quando há germinação de conídios e crescimento de hifas (JENKS; NAM; HOENIGL, 2021). A detecção de GM pode ser realizada a partir do teste de ELISA (MARR et al., 2004; PFEIFFER; FINE; SAFDAR, 2006; PASQUALOTTO et al., 2010; XAVIER et al., 2013). Comercialmente, é disponibilizado o ELISA sanduíche Platelia™ *Aspergillus* EIA (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), o qual utiliza a sensibilização dos poços da placa com anticorpos monoclonais EBA-2 de rato para detecção da GM na amostra clínica. A leitura do teste é realizada a partir da densidade óptica observada, e é considerada positiva quando $\geq 0,5$ no soro, e $\geq 1,0$ no lavado broncoalveolar (LBA). O diagnóstico de aspergilose a partir do ELISA de GM pode resultar em falsos-positivos em pacientes em uso de antibióticos de origem fúngica, principalmente β -lactâmicos, e também podem ocorrer reações cruzadas com outras infecções fúngicas (AQUINO; GOLDANI; PASQUALOTTO, 2007; XAVIER et al., 2009; BOONSARNGSUK et al., 2010).

Em atualização do ELISA, testes mais recentes, conhecidos como *point of care*, imunocromatográficos, que são de simples aplicação na rotina, não necessitando de equipamentos laboratoriais avançados e com resultados disponíveis em menos de uma hora, utilizam como alvo antigênico a GM (MERCIER et al., 2020). Esses testes rápidos para a

aspergilose estão disponíveis como o ensaio de fluxo lateral (LFA) e o dispositivo de fluxo lateral (LFD) (JENKS et al., 2019). Um dos kits comercialmente disponíveis associado a LFA é o sôna *Aspergillus galactomannan* LFA (IMMY, Norman, OK, USA), sendo construído com anticorpos específicos para GM, conjugados com ouro coloidal, permitindo que o antígeno presente na amostra, à medida que a mesma é absorvida pela tira do teste por fluxo capilar, resulte na ligação antígeno-anticorpo e em linha de teste visível quando positivo. O teste de LFA possui uma sensibilidade e especificidade de 85% e 80%, respectivamente em amostras respiratórias de pacientes em UTI (MERCIER et al. 2020). Para o LFD é disponibilizado o kit comercial *AspLFD* (OLM Diagnostics, Newcastle Upon Tyne, UK), que utiliza anticorpos monoclonais conjugados com esferas de nitrocelulose que detectam a GM nas amostras dos pacientes, nesse teste, a amostra é absorvida pela tira teste, e quando entra em contato com o anticorpo forma o complexo que delineiam a linha de positividade. A sensibilidade e especificidade relacionada a UTI em amostras respiratórias é de 65% e 85%, respectivamente (JENKS et al., 2021).

Outro potencial biomarcador circulante para detecção de aspergilose é a detecção de 1,3- β -D-glucano, polissacarídeo presente na parede celular de diversos fungos patogênicos (PATTERSON et al., 2016). Porém, a presença desse antígeno indica a presença de invasão fungica, mas não tem especificidade para *Aspergillus* spp., podendo estar associada a outras doenças como candidíase, fusariose, pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2005; LAMOTH et al., 2012). Além disso, pode apresentar resultados falso-positivos associado a interação com antibióticos que contém glucana (MARTY et al., 2006; LISS et al., 2016).

A pesquisa de DNA de *Aspergillus* spp. para o diagnóstico é realizada principalmente utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), com marcadores moleculares dos genes 18S do RNA ribossomal (rRNA), região do espaçador transcrito interno do rRNA e o DNA mitocondrial (BOCH et al., 2016). Até o momento, o qPCR não foi amplamente adotado na rotina clínica de diagnóstico, devido à dificuldade de padronização e validação, porém, diferentes estudos tem demonstrado o seu alto potencial em aumentar a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de aspergilose, em colaboração ao diagnóstico realizado utilizando biomarcadores, como a GM (CADENA; THOMPSON; PATTERSON, 2016, 2021). Existem kits comercialmente disponíveis de qPCR para diagnóstico de aspergilose, capazes de diagnosticar as principais espécies patogênicas de *Aspergillus* spp., e identificar a presença de genes de resistência antifúngica, porém não são de fácil aquisição devido ao seu alto custo, e ainda não são liberados para uso no diagnóstico clínico

no Brasil (LASS- FLÖRL, 2019; SABINO; SIMÕES; VERÍSSIMO, 2020).

Além dos testes diagnósticos supracitados, os achados de imagem a partir de radiografia de tórax e tomografia computadorizada são testes complementares no diagnóstico da aspergilose. Em pacientes neutropênicos, a API apresenta-se como nódulos pulmonares com infiltrados ao redor, sendo chamados de sinal do halo, podendo ocorrer cavitação produzindo o chamado “sinal do crescente aéreo” (GREENE, 2005). Porém, esses sinais mais típicos da API dificilmente são observados em pacientes não neutropênicos, nesses pacientes os achados radiológicos mais frequentes são inespecíficos, incluindo infiltrados, opacidades e consolidações (BLOT et al., 2012).

2.3.3 Definição de Aspergilose em UTI

O diagnóstico provado da API só é possível com evidência de hifas de *Aspergillus* spp. invadindo tecido na histopatologia associada ao isolamento de *Aspergillus* spp. em cultura. Dado as contraindicações de realização de procedimento invasivo para coleta de tecido pulmonar em pacientes em estado crítico, algoritmos baseados principalmente em sinais e sintomas, achados micológicos e radiológicos permitem inferir o diagnóstico provável ou possível da aspergilose para início do manejo correto do paciente.

O principal algoritmo para diagnóstico da aspergilose provável foi definido pelo Grupo Cooperativo da Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento de Câncer e Infecções Fúngicas Invasivas e do Grupo de Estudo de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (EORTC/MSG) (DE PAUW et al., 2008), e baseia-se em três critérios obrigatórios, sendo esses:

- (1) Fatores do hospedeiro (pelo menos um)
 - a. História recente de neutropenia ($500 \text{ neutrófilos/mm}^3$) por 110 dias;
 - b. Recebimento de transplante halogênico de células tronco;
 - c. Uso prolongado de corticosteroides em um dose mínima de $0,3\text{mg/kg/dia}$ por 13 semanas;
 - d. Tratamento com outros imunossupressores de células T reconhecidos;
 - e. Imunodeficiência grave hereditária;
- (2) Clínica característica de aspergilose em tomografia computadorizada (TC) (pelo menos um)
 - a. Lesões densas bem circunscritas com ou sem sinal de halo;
 - b. Sinal crescente aéreo;
 - c. Cavidade;

(3) Critério micológico (pelo menos um)

- a. Exame direto (microscopia direta, citologia ou cultura) no escarro, LBA ou escovado brônquico;
- b. Exames indiretos (detecção de antígeno ou constituintes da parede celular).

Porém, esse algoritmo é direcionado para pacientes neutropênicos, com malignidade hematológica, receptores de transplante de órgãos sólidos ou que apresentem outra imunossupressão grave. Sendo assim, esses critérios não abrangem os pacientes internados em UTI devido a outros fatores, portanto, novos algoritmos clínicos para esse grupo de pacientes têm sido descritos na literatura. Nessa linha, Blot e colaboradores (2012) realizaram o projeto AspICU multicêntrico internacional, que culminou com a sugestão de adaptação do algoritmo da EORTC/MSG para abrangência de pacientes da população geral internada em UTI. Os autores denominaram como aspergilose provável aqueles pacientes em que se encontravam os seguintes critérios:

(1) Cultivo de trato respiratório inferior positivo para *Aspergillus* spp.;

(2) Sinais e sintomas compatíveis (pelo menos um)

- a. Febre refratária há pelo menos três dias de tratamento antibacteriano e sem nenhuma outra causa aparente;
- b. Dor pleurítica no peito;
- c. Rubor pleurítico;
- d. Dispneia;
- e. Hemoptise;
- f. Insuficiência respiratória apesar do uso de antibióticos e suporte ventilatório;

(3) Exames de imagem anormais por radiografia de tórax ou TC dos pulmões;

(4) Pelo menos um dos itens 4^a ou 4^b

4^a Fatores de risco do hospedeiro (pelo menos um)

- a. Neutropenia (contagem absoluta de neutrófilos $500/\text{mm}^3$) antes ou no momento da admissão na UTI;
- b. Malignidade hematológica ou oncológica tratada com agentes citotóxicos;
- c. Tratamento com glicocorticosteróides (0,20mg/dia);
- d. Imunodeficiência congênita ou adquirida;
- e. Doenças subjacentes (DPOC, doença hepática, alcoolismo, diabetes, doença renal, entre outras);

4^b Cultura semiquantitativa positiva para *Aspergillus* spp. de LBA, sem crescimento bacteriano, juntamente com esfregaço citológico positivo

mostrando hifas ramificadas.

Assim, foi concluído que um algoritmo clínico simples possui fácil operacionalidade na rotina clínica, principalmente quando associada a uma doença que pode ser letal se não tratada, e quando comparado aos critérios EORTC/MSG abrange outros grupos de risco para a API em pacientes UTI (BLOT et al. 2012; BLOT et al 2019).

Em 2021, Hamam e colaboradores fizeram uma alteração no AspICU, incluindo os biomarcadores para *Aspergillus* spp. como critério micológico adicional ao cultivo, incluindo no critério micológico amostras positivas para testes de antígeno GM (amostras respiratórias e soro), assim como qPCR (HAMAM et al. 2021). Esse critério foi projetado para ser aplicado a qualquer paciente que precise de internação em UTI por problemas respiratórios, independente dos fatores de risco, utilizando os mesmos critérios de entrada, de hospedeiro e radiológicos do AspICU (HAMAM et al. 2021).

Estudos adicionais tem sugerido que a positividade do teste de GM em LBA como critério de entrada ao invés do cultivo positivo para *Aspergillus* spp. apresenta maior sensibilidade para posterior avaliação dos critérios do hospedeiro (BASSETTI et al., 2019; JENKS; NAM; HOENIGL, 2021). Atualmente, os critérios para definição internacional e aprimorada da aspergilose em UTI ainda estão sendo aprimorados, porém, é necessária a avaliação da disponibilidade de testes do local em que será aplicado o algoritmo para a melhor escolha (BASSETTI et al., 2019, 2021).

São sugeridos algoritmos aplicáveis para definir provável IAPA em UTI, os quais fazem algumas modificações no critério AspICU para que os critérios se encaixem a esse grupo de risco específico. Nesse caso, como critério de entrada há o paciente com sintomas respiratórios semelhantes a Influenza, com posterior confirmação, depois avaliação de presença de exames radiológicos de pulmão com infiltrados pulmonares, adicionalmente a pelo menos um fator do hospedeiro e critério clínico (semelhante AspICU), e pelo menos dois critérios micológicos, podendo ser cultura positiva de amostra trato respiratório, ou biomarcador GM positivo de amostra respiratória ou soro (SCHAUWVLIEGHE et al., 2018; VERWEIJ et al., 2020).

Para o diagnóstico de provável CAPA também foram descritos algoritmos clínicos/laboratoriais, sendo o critério de entrada a suspeita ou positividade para SARS-CoV-2 e posterior preenchimento dos fatores de hospedeiro, alterações radiológicas e critério micológico (KOEHLER et al., 2021; WHITE et al., 2021).

Para o diagnóstico de provável CAPA, White e colaboradores (2020) sugerem que quando existe critério radiológico sugestivo de aspergilose, como aqueles sugeridos no EORTC/MSG, apenas um critério micológico é suficiente, porém, se a evidência radiológica

se caracteriza como infiltrados ou opacidades inespecíficas, são necessários dois exames micológicos. E Koehler e colaboradores (2021) sugerem que apenas um critério micológico é necessário no caso de detecção de *Aspergillus* spp. em LBA (microscopia ou cultivo), GM sérica e de LBA e PCR de LBA positivo; e sugere dois testes positivos quando o critério clínico for PCR positivo em plasma, soro ou sangue.

2.3.4 Tratamento

O tratamento da aspergilose nos pacientes críticos segue a indicação que abrange também outros grupos de pacientes, porém possui algumas limitações relacionadas as interações medicamentosas principalmente dado ser uma população polimedicada (BASSETTI; PEGHIN; VENA, 2018). Além disso, a escolha e dosagem dos antifúngicos disponíveis deve ser realizada de acordo com a fisiopatologia dos pacientes, e se possível com realização de monitoramento terapêutico dos medicamentos (VENA et al., 2020).

Dentre as classes de antifúngicos disponíveis para tratamento da aspergilose destacam-se a anfotericina B e os triazóis, que atuam como fungicida e fungistático, respectivamente. Ambas classes atuam no ergosterol (componente da membrana celular fúngica), sendo que os azóis atuam na inibição da síntese dessa molécula e a anfotericina B na ligação direta. Como o ergosterol é um dos principais constituintes da membrana celular fúngica, essas ações levam a desestabilidade dessa estrutura e consequente inibição ou morte fúngica (ASHLEY et al., 2006). O ergosterol é uma molécula similar ao colesterol da membrana celular humana, sendo um dos principais motivos da toxicidade dos antifúngicos (CHOWDHARY et al., 2014).

Os triazóis são o tratamento de primeira escolha para aspergilose, sendo o voriconazol a terapia primária recomendada para os pacientes com API, com dose recomendada de 6mg/kg 12/12h por via endovenosa (IV). Quanto a efeitos colaterais sua composição pode acumular-se em pacientes com insuficiência renal, e sofrer ações de interações medicamentosas (LUONG et al., 2016). O itraconazol é administrado principalmente por via oral, e não é recomendado para os pacientes com infecções graves e com risco de vida, sendo mais associado a terapia de manutenção, com doses de 200mg 12/12h de 6 a 12 semanas (PATTERSON et al., 2016). O isavuconazol tem demonstrado eficácia promissora, com redução de toxicidade e de interações medicamentosas, sendo juntamente ao voriconazol, primeira escolha de tratamento para API, porém, sua eficácia no grupo de pacientes críticos ainda não foi pontualmente avaliada (MAERTENS et al., 2016).

A anfotericina B (AMB) desoxicolato por muito tempo foi considerado como o antifúngico de escolha para a API, porém essa formulação apresenta alta taxa de efeitos

colaterais graves, como febre, calafrios, mialgias, broncoespasmos, náuseas e vômitos, juntamente com toxicidade renal (hipocalemia, acidose tubular renal, etc.), sendo seu uso associado a elevada mortalidade (~50%) (BATES et al., 2001; HAMILL, 2013). Sendo assim, o uso de AMB só é recomendado em casos que não haja outras alternativas antifúngicas. Frente a isso, foram desenvolvidas novas formulações de AMB, como AMB lipossomal (3-5mg/kg por dia, IV) e AMB complexo lipídico (5mg/kg por dia, IV), as quais apresentam nefrotoxicidade reduzida, e são indicadas quando o uso de azóis é contra indicado, devido a interação medicamentosa, ou intolerância do paciente (PATTERSON et al., 2016).

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos que inibem a síntese da 1,3- β -glucana, um polissacarídeo presente na parede celular de muitos fungos patogênicos, reduzindo a toxicidade para as células humanas, considerando que estas não possuem parede celular. Para a aspergilose, as equinocandinas (50-70mg por dia) são consideradas como tratamento secundário em caso de limitações para o uso dos azóis (PATTERSON et al., 2016).

A duração do tratamento antifúngico para API não é uma questão claramente definida, sendo recomendado um tratamento continuado sempre considerando a condição e a resposta clínica do paciente ao tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar dados clínico-epidemiológicos e exames laboratoriais de diagnóstico de aspergilose em pacientes críticos com e sem covid-19 em uma UTI no extremo sul do país.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever dados clínico-epidemiológicos da população do estudo;
- Definir a taxa de isolamento de *Aspergillus* spp. de amostra respiratória dos pacientes na UTI;
- Avaliar o desempenho dos biomarcadores para o diagnóstico da doença;
- Determinar a prevalência de aspergilose provável em pacientes covid-19 (pCAPA) e não-covid-19 (pIPA) na UTI;
- Determinar a incidência de aspergilose na UTI no período do estudo.

4. ARTIGO-MANUSCRITO

Aspergillosis in critically ill patients with and without Covid-19 in Southern Brazil

Mariana Rodrigues Trápaga^{1,2}, Vanice Rodrigues Poester^{1,2}, Rossana Patrícia Basso^{2,3}, Bianca dos Santos Blan^{1,2}, Livia Silveira Munhoz², Alessandro C. Pasqualotto^{4,5}, Talita da Fontoura Werner³, Maria Letícia Figurelli³, David A. Stevens^{6,7}, Andrea von Groll^{1,8}, Melissa Orzechowski Xavier^{1,2}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil
2. Laboratório de Micologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brasil
3. Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr., Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil
4. Laboratório de Biologia Molecular, Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS, Brasil
5. Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil
6. California Institute for Medical Research, San Jose, CA, USA.
7. Div. of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Stanford University Medical School, Stanford, CA, USA.
8. Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

Abstract

The impact of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in severe Covid-19 patients and innon-neutropenic critically ill patients in intensive care units (ICU) has been demonstrated in the last decades. However, there are still scarce epidemiological data in distinct regions. We evaluated the prevalence and clinical-epidemiological data of IPA in patients with and without Covid-19 on mechanical ventilation in the ICU of a tertiary hospital in the southern region of Brazil. Eighty-seven patients admitted between June 2020 and August 2022 were included, of which 31 had severe Covid-19. For the diagnosis of aspergillosis, we used algorithms that considers host factors and mycological findings, including culture, immunoassay for galactomannan detection and qPCR. In both groups, probable/putative aspergillosis occurred 16% of the patients (5/31 in covid-19 group; 9/56 in critical ill patients without Covid-19). The overall incidence of aspergillosis in the hospital ICU was 78 cases/1000 hospitalizations, highlighting the necessity of physicians to be aware of the disease, as well as the necessity to improve the access of patients to these more sensitive and robust diagnostic tests.

Key-words: Covid-19 associated pulmonary aspergillosis; diagnosis; galactomannan; qPCR; intensive care unit.

INTRODUCTION

For the first time, in 2022 the World Health Organization (WHO) listed the main fungal pathogens that require attention for research, development, and public health actions (1). *Aspergillus fumigatus* is in the critical group, mainly due to its impact as a cause of invasive fungal diseases in immunosuppressed patients.

Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is lethal in immunocompromised patients, including those with hematopoietic stem cells or solid organ recipients, those receiving immunosuppressive drugs and patients with prolonged neutropenia (2). Furthermore, in recent decades, the impact of IPA on critically ill patients in intensive care units (ICU) has been demonstrated (3–5). In this patient group, *Aspergillus* spp. infection can result in a mortality rate of up to 67% (4,6–9), mostly due to lack of clinical suspicion and late diagnosis.

Risk factors for IPA in ICU patients include chronic obstructive pulmonary disease (COPD), kidney disease and cirrhosis, viral respiratory diseases, HIV infection, and diabetes mellitus (DM). IPA is the fungal infection highly associated with the necessity for ventilatory support (3,9,10). Regarding viral respiratory diseases, influenza-associated pulmonary aspergillosis (IAPA), and Covid-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA) are newly emphasized (11,12). Approximately 20% of patients admitted to the ICU with influenza develop IAPA (13,14), and since the beginning of the Covid-19 pandemic, studies have shown CAPA prevalence of up to 35% in patients with Covid-19, with a higher mortality rate than Covid-19 patients without fungal infection (15–18).

An early diagnosis and a correct management of aspergillosis in ICU patients decreases the high mortality rates and the length of hospital stay; however, the diagnosis of aspergillosis is a challenge. Distinct algorithms based on patient risk factors have been proposed to achieve more standardized classification. The European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group (EORTC/MSG) proposed one of the main algorithms for classifying aspergillosis as proven, probable, or possible in neutropenic patients (19). More recently other algorithms directed to critically ill patients, IAPA and CAPA, were published considering the specificities of each group of risk (10,11,17,20,21). These algorithms include mycological criteria, risk factors, clinical signs, and thoracic imaging signals, allowing for the classification of aspergillosis as probable, possible, or putative. Histopathological evidence of fungal tissue invasion is necessary to classify a proven aspergillosis case.

Since aspergillosis is not a notifiable disease, there is a lack of knowledge regarding its epidemiology in different regions, including South America (22). Southern Brazil is one of the regions with a paucity of research regarding aspergillosis in critically ill patients. Therefore, we

evaluated the prevalence and clinical-epidemiological data of IPA and CAPA in patients with and without Covid-19 who received mechanical ventilation in the ICU at a tertiary hospital in the south region of Rio Grande do Sul, the southern state of the country.

MATERIAL AND METHODS

Study design

A cross-sectional and retrospective study was conducted, including data and clinical samples of patients admitted between June 2020 and August 2022 to the adult ICU of a hospital in southern Brazil, University Hospital Dr. Miguel Riet Correa Jr. from the Federal University of Rio Grande, Brazil. This is a tertiary hospital with 248 beds, 10 Covid-19 adult ICU, and six adult ICU, which serves as a regional reference service for HIV/AIDS patients.

Inclusion criteria

All patients >18 years of age who were admitted to the ICU of our hospital between June 2020 and August 2022 and met the criteria of mechanical ventilation (MV) support, and tracheal aspirate (TA) samples and/or blood collection to investigate a respiratory fungal infection were included. Patients whose data regarding mycological test results were not available were excluded.

Data collection

Clinical-epidemiological data were evaluated from online medical records, including age, sex, underlying diseases (including Covid-19, tuberculosis, HIV, COPD, diabetes, hypertension, alcoholism, smoking, drug use, heart failure, kidney disease, obesity), use of corticosteroids and antifungal drugs, length of stay in ICU and MV, thoracic imaging exams, as well as the outcome (dead, alive) after 90 days of ICU discharge. Mycological test results were obtained from the database of the Mycology Laboratory of the Faculty of Medicine (FAMED/FURG). The results of TA culture were classified as positive or negative for *Aspergillus* sp. isolation, and the results of the *Aspergillus* galactomannan lateral flow assay (GM-LFA) (IMMY, Norman, OK, USA), which is routinely performed in all critically ill patients with *Aspergillus* spp. isolated in culture from a TA sample at the ICU of our hospital, were classified according to the galactomannan index determined by the test kit reader, with an index >2 or >0.7 considered positive in TA and serum samples, respectively (23,24)

Molecular tests

Respiratory (TA) and serum samples from the patients included in the study, previously stored in the biorepository (Ethics Committee of FURG CEP 284/2018), were prospectively analyzed by real-time PCR (qPCR) for the detection of the 18s rRNA subunit of the *Aspergillus*.

DNA was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) following the manufacturer's recommendations. Then, qPCR was performed using the GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Corporation, Wisconsin, USA), the primers forward (3' TTGGTGGAGTGATTTGTCTGCT 5') and reverse (3' TCTAAGGGCATCACAGACCTG 5') in a final concentration of 0.3 µM, and the probe FAM (3' TCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGC 5') in a final concentration of 0.2 µM. In addition, an internal control of the DNA extraction was performed to detect human RNA polymerase, using the forward primer (5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3') and reverse primer (5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3') with a final concentration of 0.4 µM, and the probe (5'-VIC-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG -QSY-3') with a final concentration of 0.2 µM. The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 50 °C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 min and 60°C for 1 min for annealing and extension. The test was performed with a positive control, using DNA from an *Aspergillus* sp. clinical isolate, and DNA from a human clinical sample, and a sterility control using RNase and DNase-free water. The tests were run on the Step-One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). To evaluate a broad range, the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Instrument Software was used, and the reaction was considered positive when the cycle threshold (CT) was <36 (25,26).

Case definition

Putative CAPA (pCAPA) was defined according to the White et al. (2020) algorithm (20). In summary, patients with pCAPA were those with all the following: (a) a positive culture of a TA sample for *Aspergillus* spp, (b) at least one risk factor and/or one relevant clinical sign, (c) abnormal thoracic imaging, (d) at least one biomarker positive (Figure 1). In critically ill patients without Covid-19, probable invasive pulmonary aspergillosis (pIPA) was defined according to the BM-Asp-ICU algorithm (21). In summary, pIPA cases included patients with all the following: (a) a positive culture for *Aspergillus* spp. from TA, (b) at least one risk factor, (c) at least one relevant clinical sign, (d) abnormal clinical imaging, (5) a positive biomarker (Figure 1).

In both groups of patients, with and without Covid-19, colonization was defined as a positive culture for *Aspergillus* spp. from a TA sample that did not meet at least one of the criteria (b), (c), (d) for pCAPA and (b), (c), (d), (e) for pIPA.

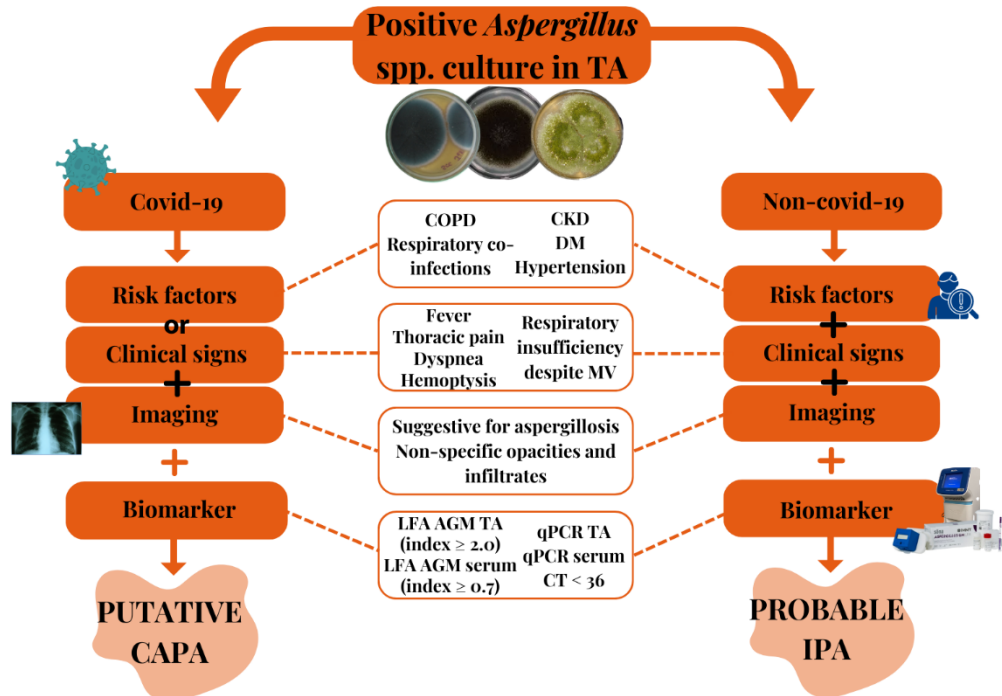


Figure 1: Flowchart used for the diagnosis of putative CAPA and probable IPA in ICU patients. *Legend:* TA: tracheal aspirate; CAPA: Covid-19-associated pulmonary aspergillosis; MV: mechanical ventilation; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CKD: chronic kidney disease; DM: diabetes mellitus; LFA: lateral flow assay; AGM: *Aspergillus* galactomanannan; qPCR: real-time polymerase chain reaction; CT: cycle threshold; IPA: invasive pulmonary aspergillosis.

Ethical aspects

The study was approved by the Research Ethics Committee in the Health Area of the Federal University of Rio Grande (CEP/FURG), process 23116.006049-2018-10.

Statistical analyses

Data were analyzed by descriptive and frequency tests. The Mann-Whitney test was used to analyze non-parametric data from independent groups, such factors associated with aspergillosis, Chi-square test to compare sex, and the outcome of these patients, and Kruskal-Wallis test to compare the age of these patients, between groups with and without pCAPA and pIPA. Overall incidence rate of aspergillosis was calculated per one-thousand hospitalizations of patients admitted in ICU at UH-FURG/Ebserh in the period of study. All tests were performed using SPSS 20.0 statistical program (IBM, Chicago, IL, US).

RESULTS

Eighty- seven patients were included in the study, of whom 16% were considered to have pIPA (9/56) or pCAPA (5/31). Of the total patients, 48.3% (42/87) were men, with a median age of 54 years (range: 20–88 years). The median length of stay in the ICU and MV was 15 days (ranging from 2 to 82 and from 2 to 80, respectively). The most common underlying disease was hypertension in 38% of patients (n=33), followed by chronic kidney disease (CKD) in 27.5% (n=24), COPD in 25.3% (n=22), DM in 24.1% (n=21), HIV infection in 23% (n=20), and/or TB in 10.3% (n=9). A total of 31 severe Covid-19 patients (35.6%) were diagnosed with SARS-CoV-2 DNA detection by qPCR on nasopharyngeal swabs or TA. Overall mortality rate in 90 days was 64.3% (n = 56/87).

Table 1: Clinical-epidemiological data of patients, according to the group evaluated for CAPA or IPA.

	Total of patients (n=87)	Covid-19 (n= 31)	Non-covid-19 (n= 56)	P value
Demographics				
Median of age in years	54 (20-88)	52 (22-75)	56 (20-88)	0.148
Male % (n)	48.2 (42)	48.4 (15)	48.2 (27)	0.988
Risk Factors % (n)				
Hypertension	37.9 (33)	42 (13)	35.7 (20)	0.863
Diabetes mellitus	24.1 (21)	29 (9)	21.4 (12)	0.260
CKD	27.5 (24)	22.5 (7)	30.3 (17)	0.249
COPD	25.3 (22)	16.1 (5)	30.3 (17)	0.144
Obesity	15 (13)	29 (9)	7.1 (4)	0.006
Kidney transplant	2.3 (2)	7.7 (2)	0	
Co-infections % (n)				
HIV	23 (20)	3.8 (1)	40 (19)	0.001
TB	10.3 (9)	3.8 (1)	14.2 (8)	0.107
Thoracic Imaging % (n)				0.076
Suggestive for aspergillosis*	26.4 (23)	19.4 (6)	30.3 (17)	
Non-specific**	48.3 (42)	64.5 (20)	39.3 (22)	
Missing	25.3 (22)	16.1 (5)	30.4 (17)	
ICU median				
Days in ICU, days, median	15 (2-82)	17 (4-82)	13.5 (2-58)	0.011
Days in MV, days, median	15 (2-80)	19 (7-68)	9.5 (2-80)	<0.001
Corticosteroid therapy in ICU	77 (67)	87.1 (27)	71.4 (40)	0.243
Outcome % (n)				0.297
Dead	64.3% (56)	64.5% (20)	64.3% (36)	
Alive	28.7% (25)	22.5% (7)	34% (19)	
Missing	7% (6)	13% (4)	1.7% (1)	

Legend: COPD: chronic obstructive pulmonary disease; TB: tuberculosis; ICU: intensive care unit; MV: mechanical ventilation; CKD: chronic kidney disease; *cavity and/or nodule and/or tree-in-bud; **nonspecific infiltrates and consolidation, diffuse reticular and alveolar opacities,

pleural fluid.

Mycological Culture, Thoracic Imaging and Biomarkers results

Results of fungal culture of 109 TA from 87 patients were available. *Aspergillus* spp. was detected in at least one TA sample from 22 patients (25.3%) (Figure 2).

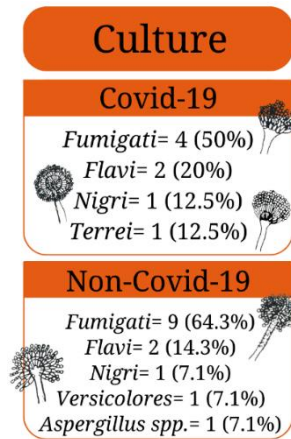


Figure 2: Results of sections on *Aspergillus* spp. culture in the group with Covid-19 and non-Covid-19.

Thoracic imaging was available for 66 patients, including all patients with TA cultures positive for *Aspergillus* spp. (n=22). Of these, 26 patients with severe Covid-19, and them four (15.4%) showed lesions compatible with aspergillosis, including cavity and nodules. Moreover, non-Covid-19 patients included 19 (47.5%) patients with lesions compatibles with aspergillosis including cavity, nodules, and/or tree-in-bud. Ground-glass patterns, calcification, reticular opacities, bronchiectasis, bronchial thickening, and pleural fluid were the other non-specific findings.

The results of GM of TA were available for 20/22 patients with positive culture of *Aspergillus* spp., and qPCR of TA were available for all these patients. The GM of serum was available for 14/22 patients, and the qPCR of serum was available for 16/22 patients who had positive culture for *Aspergillus* spp. (Figure 3)

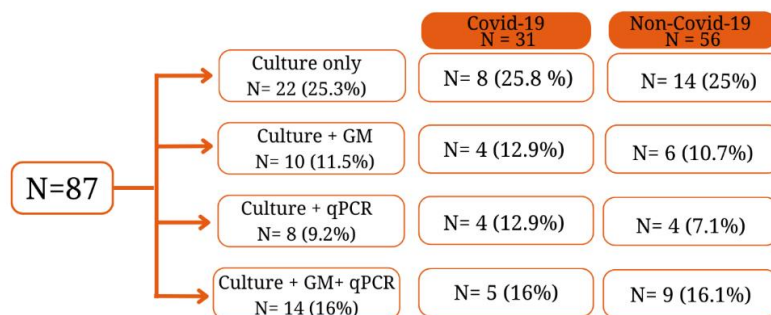


Figure 3: Positivity on *Aspergillus* culture and biomarkers in combination in the group Covid-19 and non-Covid-19.

Putative CAPA diagnosis

Among the 31 severe Covid-19 patients included, *Aspergillus* sp. was recovered in the culture of respiratory samples from eight (25.8%). Of these, three patients were classified as colonizing and five were diagnosed with putative CAPA, representing a rate of 16.1% culture positivity of CAPA (5/31) (Table 2). The median age of these patients was 63 years (range, 22–68 years), and 60% (3/5) were men. The median total length of stay in the ICU, from admission to outcome, was 25 days (range, 9–58 days), and that on MV was 49 days (range, 9–58 days). The diagnosis of pCAPA was made after a median of 13 days (range, 7–38 days) of the patient admission to the ICU and MV.

Sixty percent (3/5) of pCAPA patients died during the study, at a median of 10 days (range, 2–18 days) after the diagnosis of pCAPA. Two of these patients were also diagnosed with septicemia caused by *Klebsiella* spp. and/or *Acinetobacter* spp.. Regarding the two pCAPA patients discharged alive from the ICU, one was admitted to the hospital with a lowered level of consciousness, dyspnea, and pneumothorax, and the diagnosis of CAPA occurred after four days in the ICU. A positive culture of a TA sample for *Aspergillus* section *Nigri* plus a positive serum GM (index of 1.84), and a positive TA GM (index of 2.16) defined the diagnosis. Antifungal therapy with amphotericin B deoxycholate (AMBd) (50 mg, IV, 1x/day for 51 days) was prescribed, and the patient was discharged after 51 days, with oral itraconazole (ITZ) (200 mg, PO bid) as a maintenance therapy. The other survivor was admitted in the ICU with dyspnea and acute renal failure, required hemodialysis and after 14 days in MV, had a positive culture of a TA sample for *Aspergillus* section *Terrei* and a positive TA GM (index of 5.59). The patient had atelectasis of the left lung and after a thoracic drainage of a pyosanguinous fluid showed significant clinical improvement. Data regarding the prescription of an antifungal therapy was not available. The mortality rate was similar among pCAPA and non-CAPA covid-19 patients (60% and 80%, respectively) ($p>0.05$).

Table 2: Clinical-epidemiological and laboratory data of patients diagnosed with putative “Covid-19 associated with pulmonary aspergillosis”. According to White et al. 2020.

Patient number Age/sex	AT mycological culture	Risk Factors/ Comorbidities	Imaging	Biomarkers				Days in ICU	Days in MV	Antifungal treatment	Corticosteroid therapy	Outcome after 90 days
				GM AT	GM serum	CT qPCR TA	CT qPCR serum					
5936 55/M	A. section <i>Nigri</i>	COPD, severe heart failure	bronchiectasis, nodule, pleural thickening	2.16	1.84	neg	29.92	58	58	AMBd (50mg IV 1x/day/51 days) and ITZ (200 mg PO 2 x/day/4 months)	Prednisone (40 mg PO 1x/day/1 day)	alive
6889 22/M	A. section <i>Terrei</i>	PE, obesity	ground-glass pattern	5.59	neg	neg	neg	49	49	NA	Hydrocortisone (100 mg IV 1x/day/6 days)	alive

5987 68/F	A. section <i>Fumigati</i>	hypertension, kidney disease, stroke	ground-glass pattern, interstitial infiltrate	4.22	1.11	18.78	27.32	9	9	AMBd (75mg IV 1x/day/5 days)	Dexamethasone (6 mg IV 1 x/day/2 days)	dead
6274 63/M	A. section <i>Fumigati</i>	hypertension, kidney disease, DM	ground-glass pattern, pleural fluid	ND	neg	neg	29.25	51	51	AMBd (50 mg IV 1 x/day/21 days)	Hydrocortisone (100 mg IV 3 x/day/3 days)	dead
6499 64/F	A. section <i>Flavi</i>	DM	ground-glass pattern, cavity, calcification	19.57	ND	21.36	ND	16	15	AMBd (50 mg IV 1 x/day/3 days)	Dexamethasone (6 mg IV 1 x/day/16 days) and Hydrocortisone (100 mg IV 3 x/day/3 days)	dead

Legend: M: male; F: female; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; DM: diabetes mellitus; PE: pulmonary embolism; CT: cycle threshold; TB: tuberculosis; GM: *Aspergillus* galactomannan; TA: tracheal aspirate; ICU: intensive care unit; MV: mechanical ventilation; NA: not available; ND: not done; neg: negative; AMBd: amphotericin B deoxycholate; ITZ: itraconazole, IV: intravenous; PO: oral.

Probable aspergillosis diagnosis in non-Covid ICU patients

Of the 56 critically ill non-Covid-19 patients included, *Aspergillus* spp. were recovered in culture from at least one respiratory sample in 14 (25%). Five of them were classified as *Aspergillus* colonization, and nine as pIPA, corresponding to a rate of 16% of this fungal disease in critically ill non-Covid-19 patients from our ICU (9/56) (Table 3). The median age of pIPA patients was 52 (ranging from 40 to 84), 55.5% (5/9) were men, and the diagnosis of pIPA occurred after a median of 9 days (ranging from 7-22) of the admission in the ICU.

A total of 66.7% (6/9) patients with pIPA died, with a median of 16 days (range, 0–73 days) after diagnosis (Table 4). Three of these patients (50%) were HIV positive, with a low CD4 count (<200 cells) and co-infections, such as bacterial meningitis and neurotoxoplasmosis. Of the three patients alive, all had a positive culture for *Aspergillus* section *Fumigati* in TA. One diagnosis occurred together with the biomarker serum GM (index of 1.1) after 12 days in the ICU. Another patient was admitted to the ICU with high viral load of HIV (>100000 cells), cachexia, and respiratory symptoms and had a positive serum biomarker (GM index of 3.31) after 9 days in the ICU. The other patient was admitted because of worsening renal function and was undergoing hemodialysis. The biomarker positive was GM-TA (index of 13.37), and he experienced several complications including acute renal failure, septic shock caused by *Klebsiella* spp., and a thoracic drain, but survived. Patients were treated with AMBd and ITZ, and discharged from the hospital after a median number of 89 days (range–50-115) from the diagnosis. Mortality rates were similar between the group with pIPA and critically ill patients without fungal infection, 66.7% (6/9) and 65.2% (30/46), respectively ($p>0.05$).

Table 3: Critically ill non-covid-19 patients diagnosed with probable aspergillosis. According to Hamam et al. 2021.

Patient number Age/sex	AT mycological culture	Risk Factors/ Comorbidities	Clinical signs	Imaging	Biomarkers				Days in ICU	Days in MV	Antifungal treatment	Corticosteroid therapy	Outcome after 90 days
					GM TA	GM serum	qPCR TA	qPCR serum					
6098 60/F	A. section <i>Fumigati</i>	COPD, hypertension, DM	fever, and worsening of respiratory symptoms, dyspnea	ground- glass pattern, diffuse thickening of the bronchial walls	neg	1.1	neg	neg	58	8	AMBd (50mg IV 1x/day/21 days) and ITZ (200mg PO 2x/day/4 months)	Methylpredni solone (60mg IV 1x/day/38 days) and Prednisone (20mg PO 3x/day/26 days)	alive
6344 40/M	A. section <i>Fumigati</i>	HIV and TB	fever, and worsening of respiratory symptoms, dyspnea	ground- glass pattern, nodules, calcification	ND	3.31	neg	neg	10	7	AMBd (30mg IV 1x/day/14 days) and ITZ (200mg PO 2x/day/4 months)	Dexamethaso ne (6mg IV 1x/day/3 days) and Hydrocortiso ne (100mg IV 3x/day/29 days)	alive

6213 45/M	A. section <i>Fumigati</i>	CKD, hypertension, DM	fever, and worsening of respiratory symptoms	alveolar opacities	13.3 7	neg	neg	neg	10	7	NA	did not receive	alive
5959 77/F	A. section <i>Nigri</i>	obesity and endocarditis	fever, and worsening of respiratory symptoms	pleural fluid	ND	neg	23. 49	27.32	31	20	None	Prednisone (40mg/20mg PO 1x/day/17 days)	dead
6018 84/M	A. section <i>Flavi</i>	CKD, smoker	fever, and worsening of respiratory symptoms, hemoptyses	pleural fluid, parenchyma l consolidatio ns	neg	1.37	neg	neg	27	27	None	Hydrocortiso ne (100mg IV 2x/day/8 days) and Prednisone (30/20mg PO 1x/day/5 days)	dead

6108 63/M	A. section <i>Fumigati</i>	CKD, alcoholic	fever, and worsening of respiratory symptoms	scarring striae	8.82	neg	neg	neg	6	3	None	Hydrocortiso ne (100mg IV 3x/day/2 days)	dead
6173 42/M	A. section <i>Fumigati</i>	TB, drug user	fever, and worsening of respiratory symptoms	ground- glass pattern, reticulonod ular infiltrate	neg	1.67	neg	29.34	15	8	None	None	dead
6230 57/F	A. section <i>Fumigati</i>	obesity, hypertension, DM	fever, and worsening of respiratory symptoms	ground- glass pattern	ND	neg	neg	27.82	16	16	None	Prednisone (40/10mg PO 2x/day/22 days), and Hydrocortiso ne (100mg IV 2x/day/7 days)	dead

7967 48/F	A. section <i>Flavi</i>	HIV, hard palate sarcoma, neurotoxoplasmosis, venous ulcer	fever, and worsening of respiratory symptoms	ground- glass pattern, cavity, tree- in-bud	neg	ND	neg	29.11	26	24	AMBd (50mg IV 1X/day/5 days)	Hydrocortisone (100mg IV 1x/day/6 days)	dead
----------------------	-------------------------------	--	--	---	-----	----	-----	-------	----	----	------------------------------------	---	------

Legend: M: male; F: female; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; DM: diabetes mellitus; TB: tuberculosis; GM: *Aspergillus* galactomannan; TA: tracheal aspirate ICU: intensive care unit; MV: mechanical ventilation; NA: not available; ND: not done; neg: negative; AMBd: amphotericin B deoxycholate; ITZ: itraconazole, IV: intravenous; PO: oral.

Overall incidence rate of aspergillosis in the ICU

During the period of the study, our hospital experienced a median of 72 (range, 30–77) hospitalizations per year in the ICU. The overall incidence of aspergillosis, including pCAPA and pIPA together, was 78 cases/1,000 hospitalizations in the ICU. Clinical-epidemiological data were similar between the patients with pCAPA and pIPA with the non-pCAPA and non-pIPA, respectively (Table 4).

Table 4: Clinical-epidemiological data comparison between CAPA and non-CAPA group, and IPA and non-IPA group.

	Covid-19 (n= 31)		p	Critical ill non-Covid-19 (n= 56)		p
	Putative CAPA % (n=5)	Non-pCAPA % (n=26)		Probable IPA % (n=9)	No pIPA % (n=47)	
Demographics						
Age, years, median	63 (22-68)	51 (22-75)	0.170	57 (40-84)	55 (20-88)	0.663
Male	60 (3)	46 (12)	0.570	55.5 (5)	47 (22)	0.630
Comorbidities % (n)						
Hypertension	20 (1)	46 (12)	0.278	33.3 (3)	36.1 (17)	0.652
Diabetes mellitus	40 (2)	27 (7)	0.147	33.3 (3)	19.1 (9)	0.325
Kidney disease	40 (2)	19.2 (5)	0.309	22.2 (2)	32 (15)	0.624
COPD	20 (1)	15.3 (4)	0.797	11.1 (1)	34 (16)	0.170
Kidney transplant	0	7.7 (2)	0.521	0	0	-
Obesity	20 (1)	30.7 (8)	0.627	22.2 (2)	4.2 (2)	0.055
Co-infections % (n)						
HIV	0	3.8 (1)	0.656	55.5 (5)	29.7 (14)	0.175
TB	0	3.8 (1)	0.656	1.1 (1)	14.8 (7)	0.766
Medical Imaging % (n)			0.318	0.479		
Suggestive for aspergillosis*	40 (2)	15.4 (4)		33.3 (3)	29.8 (14)	
Non-specific**	60 (3)	65.4 (17)		66.7 (6)	34 (16)	
Missing	0	19.2 (5)		0	36.2 (17)	
ICU						
Days in ICU, days, median	25 (9-58)	17 (4-82)	0.519	16 (6-58)	12 (2-50)	0.241
Days in MV, days, median	49 (9-58)	18.5 (7-68)	0.360	8 (3-27)	10 (2-80)	0.631
Corticosteroid therapy in ICU	100 (5)	84.6 (22)	0.706	77.8 (7)	70.2 (33)	0.901
Outcome % (n)			0.921	0.933		
Dead	60 (3)	65.4 (17)		66.7 (6)	63.8 (30)	
Alive	40 (2)	19.2 (5)		33.3 (3)	34.1 (16)	

Missing	0	15.4 (4)	0	2.1 (1)
---------	---	----------	---	---------

Legend: pCAPA: putative Covid-19 associated pulmonary aspergillosis; pIPA: probable invasive pulmonary aspergillosis; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; TB: tuberculosis; ICU: intensive care unit; MV: mechanical ventilation; CKD: chronic kidney disease; *cavitation, nodule and/or tree-in-bud; ** nonspecific infiltrates and consolidation, diffuse reticular and alveolar opacities, pleural fluid.

DISCUSSION

The importance of aspergillosis in ICU patients has been highlighted in the last decades in critical ill patients (4,7,18,27). Knowledge of the local epidemiology of this disease is the first step to improving the diagnosis and correct treatment of the patients. Our study showed, for the first time, a high incidence of pulmonary aspergillosis in the ICU of a tertiary hospital in Southern Brazil, with an overall rate of 78 cases/1,000 hospitalizations.

The diagnosis of aspergillosis is a challenge, a “puzzle” that needs different tests to be made (10,21). A positive culture for *Aspergillus* spp. in a respiratory sample is not strong evidence allowing the beginning of antifungal treatment (28). In our study, 36% of the patients with *Aspergillus* spp. isolated from TA were considered colonization, which is in accordance with the colonization in ICUs rates of up to 60% described in the literature (4,29,30). On the other hand, *Aspergillus* spp. isolated from respiratory samples of critically ill patients also cannot be ignored or directly interpreted as a contamination. Since the diagnosis of aspergillosis demands a combination of tests, a positive culture is a possible predictor of the necessity to require a specific investigation for aspergillosis in that patient (21). Newer diagnostic tools are on the horizon.

To be classified as a proven aspergillosis case, hyaline and septate hyphae must be observed on histopathological examination. Given that lung biopsy is an invasive procedure not routinely performed in most tertiary hospitals, particularly in critically ill patients (19,28), biomarker detection is an important ally, allowing the classification of the disease in probable and/or putative cases (21,31). In our study, we used a combination of tests to detect and quantify the *Aspergillus* antigen galactomannan and its DNA in respiratory and/or serum samples. This combination of tests is a good strategy to a more accurate diagnosis of IPA in critically ill patients in centers where lung biopsies are not routine (21,28).

To date, qPCR has not been widely adopted in the clinical diagnostic routine because of the difficulty of standardization and validation; however, different studies have demonstrated its high potential in increasing the sensitivity and specificity for the diagnosis of aspergillosis in collaboration with the diagnosis using biomarkers such as GM (32,33). In this study, we

demonstrated the importance of having more than one biomarker method available, because using only one biomarker would result in missing diagnosed patients. If only one was chosen for Covid-19 patients we would lose 3% of the diagnosed patients (16% to 13%). In the non-Covid-19 group, 6% would be lost if we used only GM (10% to 16%), and 9% if we used only qPCR (7% to 16%).

The importance of *Aspergillus* spp. lung infection in Covid-19 patients needs recognition due to the increase of the pulmonary damage caused by this fungal infection (32). Incidence of CAPA has been described worldwide with a range from 4% to 40% (27,33,34). In our center pCAPA was diagnosed in 16% of the patients with severe Covid-19 at the ICU. The wide discrepancy in the rates of CAPA between studies around the world may be associated with epidemiological differences in the locations, different exposures to *Aspergillus*, the access to diagnostic methods, and the other risk factors of the patients from the studies, and another definitions of CAPA (30,35,36).

Regarding critically ill non-Covid-19 patients, the prevalence of 16% of probable aspergillosis showed in our study is at the median of that seen in other centers (range 7-36%) (4,9,30,37). The underlying diseases associated with aspergillosis in our study were similar to those well known as risk factors, such as hypertension, diabetes mellitus, HIV, CDK, and obesity (4,30,38). Like; given the fact that our center does not provide tertiary treatment for hematologic diseases, whereas it is a reference for the treatment of people living with HIV in the region, the frequency of patients with HIV in our ICU was slightly higher than expected.

Our study has some limitations. Firstly, given the retrospective nature of the study, we had some missing results and data regarding patient examinations and epidemiology. Moreover, the lack of qPCR tests for the influenza diagnoses in our hospital did not allow us to fully evaluate the rate of influenza associated IPA in our patients.

To the best of our knowledge, this is the first study to report epidemiological data on aspergillosis in critically ill patients admitted to the ICU of a tertiary hospital in southern Brazil. The high prevalence of the disease, corresponding to more than 15% in both groups of patients evaluated, emphasizes the need for physicians to be aware of this complication and for greater investments to improve the access of patients to specific diagnostic tests which are not easily accessible to many public and tertiary hospitals in Brazil (39).

Funding: This work was supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Acknowledgments: The authors are grateful to the Coordination for the Improvement of

Higher Education Personnel from the Ministry of Education, Brazil (CAPES - BR); to the CAPES-Print Program - Finance Code 001 and to National Council for Technological and Scientific Development.

Disclosures of Potential Conflicts of Interest: Dr. Pasqualotto and Dr. Stevens has received research grant support from Gilead, IMMY, Pfizer, United Medical, and Merck Sharp & Dohme. Other authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. WHO fungal priority pathogens list to guide research development and public health action.
2. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases*. 15 de junho de 2008;46(12):1813–21.
3. Vandewoude K, Blot S, Benoit D, Depuydt P, Vogelaers D, Colardyn F. Invasive aspergillosis in critically ill patients: Analysis of risk factors for acquisition and mortality. *Acta Clinica Belgica*. 2004;59(5):251–7.
4. Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Misset B, Meersseman W, Cardoso T, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: Clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Critical Care*. 2015;19(1):1–15.
5. Tudesq JJ, Peyrony O, Lemiale V, Azoulay E. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Nonimmunocompromised Hosts. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019;40(4):540–7.
6. Vandewoude KH, Blot SI, Benoit D, Colardyn F, Vogelaers D. Invasive aspergillosis in critically ill patients: Attributable mortality and excesses in length of ICU stay and ventilator dependence. *Journal of Hospital Infection*. 2004;56(4):269–76.
7. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ortiz-Leyba C, León C, Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, et al. Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. *Critical care (London, England)*. 2005;9(3):191–9.
8. Matthaiou DK, Dimopoulos G, Taccone FS, Bulpa P, Van Den Abeele AM, Misset B, et al. Elderly versus nonelderly patients with invasive aspergillosis in the ICU: A comparison and risk factor analysis for mortality from the AspICU cohort. *Medical Mycology*. 2018;56(6):668–78.
9. Loughlin L, Hellyer TP, Lewis White P, McAuley DF, Morris AC, Posso RB, et al. Pulmonary Aspergillosis in patients with suspected ventilator-associated pneumonia in UK ICUs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020;202(8):1125–32.
10. Blot S, Rello J, Koulenti D. Diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients: Putting the puzzle together. *Current Opinion in Critical Care*. 2019;25(5):430–7.

11. Verweij PE, Rijnders BJA, Brüggemann RJM, Azoulay E, Bassetti M, Blot S, et al. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. *Intensive Care Medicine*. 2020;46(8):1524–35.
12. Bartoletti M, Pascale R, Cricca M, Rinaldi M, Maccaro A, Bussini L, et al. Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among COVID-19 intubated patients: a prospective study. Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. 2020;
13. van de Veerdonk FL, Kolwijck E, Lestrade PPA, Hodiament CJ, Rijnders BJA, van Paassen J, et al. Influenza-associated aspergillosis in critically ill patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2017;196(4):524–7.
14. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, Verwijs R, Vanderbeke L, Van Tienen C, et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 1º de outubro de 2018;6(10):782–92.
15. Alanio A, Dellièrre S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020;8(6):e48–9.
16. Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, Duse F, Eichenauer DA, Fuchs F, et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2020;63(6):528–34.
17. Lahmer T, Kriescher S, Herner A, Rothe K, Spinner CD, Schneider J, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia: Results from the prospective AspCOVID-19 study. *PLoS ONE*. 2021;16(3 March):1–16.
18. Gangneux JP, Dannaoui E, Fekkar A, Luyt CE, Botterel F, De Prost N, et al. Fungal infections in mechanically ventilated patients with COVID-19 during the first wave: the French multicentre MYCOVID study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 1º de fevereiro de 2022;10(2):180–90.
19. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases*. 15 de junho de 2008;46(12):1813–21.
20. White PL, Dhillon R, Cordey A, Hughes H, Faggian F, Soni S, et al. A national strategy to diagnose COVID-19 associated invasive fungal disease in the ICU. 2020; 29:2161.
21. Hamam J, Navellou JC, Bellanger AP, Bretagne S, Winiszewski H, Scherer E, et al. New clinical algorithm including fungal biomarkers to better diagnose probable invasive pulmonary aspergillosis in ICU. *Annals of Intensive Care*. 2021;11(1).
22. Ministério da Saúde do Brasil. Portaria Nº 264, de 17 de Fevereiro de 2020 - Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública [Internet]. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html

23. Roman-Montes CM, Martinez-Gamboa A, Diaz-Lomelí P, Cervantes-Sanchez A, Rangel-Cordero A, Sifuentes-Osornio J, et al. Accuracy of galactomannan testing on tracheal aspirates in COVID-19-associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 1º de abril de 2021;64(4):364–71.
24. Giusiano G, Fernández NB, Vitale RG, Alvarez C, Ochiuzzi ME, Santiso G, et al. Usefulness of Sōna Aspergillus Galactomannan LFA with digital readout as diagnostic and as screening tool of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis in critically ill patients. Data from a multicenter prospective study performed in Argentina. *Med Mycol*. 18 de maio de 2022;60(5).
25. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1º de novembro de 2001;33(9):1504–12.
26. Lamberink H, Wagemakers A, Sigaloff KCE, van Houdt R, de Jonge NA, van Dijk K. The impact of the updated EORTC/MSG criteria on the classification of hematological patients with suspected invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*. agosto de 2022;28(8):1120–5.
27. Delliére S, Dudoignon E, Fodil S, Voicu S, Collet M, Oillic PA, et al. Risk factors associated with COVID-19-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients: a French multicentric retrospective cohort. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;(27):790–5.
28. Jenks JD, Nam HH, Hoenigl M. Invasive aspergillosis in critically ill patients: Review of definitions and diagnostic approaches. *Mycoses*. 1º de setembro de 2021;64(9):1002–14.
29. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, De Repentigny L, Chapman SW, et al. The Impact of Culture Isolation of Aspergillus Species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis [Internet]. Vol. 33, *Clinical Infectious Diseases*. 2001 p. 1824–57. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/>
30. Dabas Y, Mohan A, Xess I. Prognostic Scores and Azole-Resistant Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis from an Indian Respiratory Medicine ICU (ICU Patients with IA Suspicion). *Journal of Fungi*. 1º de novembro de 2021;7(11).
31. Antinori S, Corbellino M, Parravicini C. Challenges in the Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Hosts. *Current Fungal Infection Reports*. 1º de março de 2018;12(1):12–22.
32. Arastehfar A, Carvalho A, van de Veerdonk FL, Jenks JD, Koehler P, Krause R, et al. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)-From Immunology to Treatment. *J Fungi (Basel)*. 24 de junho de 2020;6(2).
33. Lamoth F, Glampedakis E, Boillat-Blanco N, Oddo M, Pagani JL. Incidence of invasive pulmonary aspergillosis among critically ill COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(12):1706–8.
34. Nasir N, Farooqi J, Mahmood SF, Jabeen K. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA) in patients admitted with severe COVID-19 pneumonia: An observational study from Pakistan. *Mycoses*. 2020;63(8):766–70.

35. Prattes J, Wauters J, Giacobbe DR, Salmanton-García J, Maertens J, Bourgeois M, et al. Risk factors and outcome of pulmonary aspergillosis in critically ill coronavirus disease 2019 patients—a multinational observational study by the European Confederation of Medical Mycology. *Clinical Microbiology and Infection*. 1º de abril de 2022;28(4):580–7.
36. Kirchhoff L, Braun LM, Schmidt D, Dittmer S, Dedy J, Herbstreit F, et al. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients in a German reference centre: Phenotypic and molecular characterisation of *Aspergillus fumigatus* isolates. *Mycoses*. 1º de abril de 2022;65(4):458–65.
37. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(2):205–16.
38. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 15 de setembro de 2004;170(6):621–5.
39. Arastehfar A, Wickes BL, Ilkit M, Pincus DH, Daneshnia F, Pan W, et al. Identification of mycoses in developing countries. *Journal of Fungi*. 1º de dezembro de 2019;5(4).

5. CONCLUSÕES

- A população do estudo caracterizou-se por uma homogeneidade entre homens e mulheres, e idade média de aproximadamente 55 anos. As principais doenças subjacentes dos pacientes críticos da UTI foram hipertensão, doença renal crônica, diabetes mellitus, DPOC e HIV;
- *Aspergillus* spp. foi isolado de amostras respiratórias em 25,3% dos pacientes internados na UTI;
- Os métodos diagnósticos tiveram desempenho semelhante, porém o biomarcador de galactomanana (11,5%) apresentou maior positividade quando relacionado ao qPCR (9,2%), e a combinação de ambos mostrou-se superior ao seu uso de forma isolada;
- Aspergilose provável ocorreu em 16% dos pacientes, tanto no grupo covid-19, quanto no grupo não covid-19;
- Uma alta incidência de API na UTI no HU-FURG/EBSERH durante o período de estudo foi demonstrada, correspondendo a 78 casos a cada mil internações.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo demonstrou pela primeira vez a incidência da aspergilose em pacientes críticos de UTI do HU-FURG/EBSERH. Além disso, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado no Sul do Brasil com esse enfoque, agregando conhecimento quanto a epidemiologia da doença na região e no país, assim como reforçando a importância da suspeição clínica e do apoio laboratorial de testes micológicos para confirmação diagnóstica.

A principal comorbidade da população geral da UTI foi a hipertensão, seguida por diabetes melitus e obesidade nos pacientes covid-19, e infecção pelo HIV no grupo não covid-19. A obesidade já é considerada um fator de risco no desenvolvimento da covid-19 grave, em contraponto com o HIV, que acaba sendo um “fator de proteção”, pelo não desenvolvimento da “tempestade de citocinas” que culmina em uma maior gravidade clínica da covid-19.

Nos pacientes com isolamento de *Aspergillus* spp. em cultivo (22/87) a principal secção encontrada foi a *Fumigati*, de acordo com o descrito na literatura. Aspergilose provável foi diagnosticada em 14 dos 87 pacientes, representando uma prevalência de 16% tanto no grupo covid-19 quanto não covid-19. As principais comorbidades associadas foram hipertensão, diabetes melitus, e doença renal crônica, e somente no grupo não covid-19 também a co-infecção por HIV.

Os biomarcadores, LFA-GM e qPCR, utilizados como testes complementares micológicos de diagnóstico, junto ao cultivo, foram similares em seu desempenho, detectando o patógeno em 10/87 e 8/87 dos pacientes, respectivamente. Porém, quando em associação, os dois testes detectaram 14/87 pacientes. Evidenciando que a disponibilidade de diferentes ferramentas, principalmente testes micológicos, são peças chave na montagem do “quebra-cabeça” que é o diagnóstico da aspergilose.

Como perspectivas futuras tem-se realizar a identificação das espécies crípticas isoladas dos pacientes da UTI, assim como avaliação do seu perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em parceria com o Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia da Fundação Oswaldo Cruz (INI-Fiocruz), no intuito de contribuir com a vigilância epidemiológica no âmbito da aspergilose. Em adição, os resultados encontrados serão apresentados e discutidos com a equipe de profissionais da saúde atuantes na UTI do HU-FURG/EBSERH e demais interessados, buscando fomentar a educação continuada e discutir fluxograma para instituir o diagnóstico da aspergilose, beneficiando diretamente os usuários do nosso Hospital.

REFERÊNCIAS

- ALANIO, A. et al. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. e48–e49, 2020.
- ALMEIDA, J. N. Jr. et al. COVID-19-associated aspergillosis in a Brazilian referral centre: Diagnosis, risk factors and outcomes. **Mycoses**, v. 65, n.4, p. 449-457, 2022.
- AQUINO, V. R.; GOLDANI, L. Z.; PASQUALOTTO, A. C. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Mycopathologia**, v. 163, n. 4, p. 191–202, abr. 2007.
- AQUINO, V. R. et al. The Performance of Real-Time PCR, Galactomannan, and Fungal Culture in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Ventilated Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). **Mycopathologia**, v. 174, p. 163-169, fev. 2012.
- ARASTEHFAR, A. et al. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)-From Immunology to Treatment. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 2, 24 jun. 2020.
- ASHLEY, E. S. D. et al. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Clinical Infectious Diseases**, n. 43, p. 28–39, 2006.
- BADDLEY, J. W. et al. Aspergillosis in Intensive Care Unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 29, 23 jan. 2013.
- BALAJEE, S. A. et al. Sequence-based identification of aspergillus, fusarium, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 877–884, 2009.
- BARNES E. A short history of invasive aspergillosis, 1920 to 1965. **The Aspergillus Website**. (www.aspergillus.org.uk), 2004;
- BASSETTI, M. et al. Developing definitions for invasive fungal diseases in critically ill adult patients in intensive care units. Protocol of the FUNgal infections Definitions in ICU patients (FUNDICU) project. **Mycoses**, v. 62, n. 4, p. 310–319, abr. 2019.
- BASSETTI, M. et al. EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Diseases: Summary of Activities of the Intensive Care Unit Working Group. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 72, n. Suppl 2, p. S121–S127, 12 mar. 2021.
- BASSETTI, M.; BOUZA, E. Invasive mould infections in the ICU setting: Complexities and solutions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, p. i39–i47, 1 mar. 2017.
- BASSETTI, M.; KOLLEF, M. H.; TIMSIT, J.-F. Bacterial and fungal superinfections in critically ill patients with COVID-19. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 11, p. 2071–2074, nov. 2020.

- BASSETTI, M. et al. Invasive pulmonary aspergillosis in intensive care units: is it a real problem? **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 2, p. 186–187, fev. 2010.
- BASSETTI, M.; PEGHIN, M.; VENA, A. Challenges and Solution of Invasive Aspergillosis in Non-neutropenic Patients: A Review. **Infectious diseases and therapy**, v. 7, n. 1, p. 17–27, mar. 2018.
- BATES, D. W. et al. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 5, p. 686–693, 1 mar. 2001.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Asperillus*. p. 1–17, 2010.
- BENNETT J. H. On the parasitic vegetable structures found growing in living animals. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, v.15, p.277-294, 1842.
- BLOT, S. I. et al. A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 1, p. 56–64, 2012.
- BOCH, T. et al. Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3- β -D-glucan, *Aspergillus* PCR, multifungal DNA-microarray, and *Aspergillus* azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: results of a prospective multicentre study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 10, p. 862–868, 1 out. 2016.
- BONGOMIN, F. et al. Chronic pulmonary aspergillosis: Notes for a clinician in a resource-limited setting where there is no mycologist. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 1–19, 2020.
- BOONSARNGSUK, V. et al. False-positive serum and bronchoalveolar lavage *Aspergillus* galactomannan assays caused by different antibiotics. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 42, n. 6–7, p. 461–468, jul. 2010.
- CADENA, J.; THOMPSON, G. R.; PATTERSON, T. F. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 125–142, 1 mar. 2016.
- CADENA, J.; THOMPSON, G. R.; PATTERSON, T. F. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 415–434, 1 jun. 2021.
- CHONG, W. H. et al. State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. **Infection**, v. 49, n. 4, p. 591–605, ago. 2021.
- CHOWDHARY, A. et al. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. **Future Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 697–711,

2014.

CONTOU, D. et al. Aspergillus-positive lower respiratory tract samples in patients with the acute respiratory distress syndrome: a 10-year retrospective study. **Annals of intensive care**, v. 6, n. 1, p. 52, dez. 2016.

CRUZ, I. C. L. V., MAGRI, M.M. Desafios no Diagnóstico de CAPA (Covid-19 Associated Pulmonary Aspergillosis) em um Hospital Quaternário Do Brasil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.26, s. 2, 2022.

DABAS, Y.; MOHAN, A.; XESS, I. Prognostic Scores and Azole-Resistant Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis from an Indian Respiratory Medicine ICU (ICU Patients with IA Suspicion). **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, 1 nov. 2021.

DE PAUW, B. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 1813–1821, 15 jun. 2008.

DELLIERE, S. et al. Risk factors associated with COVID-19-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients: a French multicentric retrospective cohort. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 27, p. 790–795, 2021.

DELSUC, C. et al. Putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with chronic obstructive pulmonary disease: a matched cohort study. **Critical care (London, England)**, v. 19, p. 421, 3 dez. 2015.

DENNING, D. W. et al. Chronic pulmonary aspergillosis: Rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 1, p. 45–68, 2016.

DENNING, D. W.; PLEUVRY, A.; COLE, D. C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 361–370, 2013.

D'HAESE, J. et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1258–1263, abr. 2012.

FANG, W.; LATGÉ, J. P. Microbe profile: Aspergillus fumigatus: A saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 8, p. 1009–1011, 2018.

FARIAS, M. E. et al. COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis in a Series of Complete Autopsies from the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and**

Hygiene, v. 106, n. 2, p. 571-573, 2022. 2022

FAWCITT, R. Fungoid Conditions of the Lungs – Part II. **British Journal of Radiology**, v. 9, p.354-378, 1936

GAMS W., CHRISTENSEN M., ONIONS A.H. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson R.A., Pitt J.I., editors. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. **Plenum Press; New York**, p. 55–62. 1985.

GANGNEUX, J. P. et al. Is the covid-19 pandemic a good time to include aspergillus molecular detection to categorize aspergillosis in icu patients? A monocentric experience. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 1–12, 2020.

GARNACHO-MONTERO, J. et al. Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. **Critical care (London, England)**, v. 9, n. 3, p. 191–199, 2005.

GEISER, D. M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. **Medical mycology**, v. 47 Suppl 1, p. S21-26, 2009.

GERSTL, B., WEIDMAN, W. H., NEWMANN, A. V. Pulmonary Aspergillosis: Report of Two Cases. **Annals of Internal Medicine**, v.28, p.662-671, 1948.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 58, n. 3, p. 145-150, mar. 2016.

GREENE, R. The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. **Medical mycology**, v. 43 Suppl 1, p. S147-154, maio 2005.

GUARNER, J.; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 247–280, abr. 2011.

HAGE, C. A. et al. Microbiological Laboratory Testing in the Diagnosis of Fungal Infections in Pulmonary and Critical Care Practice. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 200, n. 5, p. 535–550, 1 set. 2019.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, jun. 2013.

HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in mycology**, v. 95, p. 5–169, mar. 2020.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in applied microbiology**, v. 86, p. 199–249, 2014.

- HUBKA, V. et al. Taxonomic revision of Eurotium and transfer of species to Aspergillus. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 912–937, ago. 2013.
- JENKS, J. D. et al. Point-of-care diagnosis of invasive aspergillosis in non-neutropenic patients: Aspergillus Galactomannan Lateral Flow Assay versus Aspergillus-specific Lateral Flow Device test in bronchoalveolar lavage. **Mycoses**, v. 62, n. 3, p. 230–236, mar. 2019.
- JENKS, J. D.; NAM, H. H.; HOENIGL, M. Invasive aspergillosis in critically ill patients: Review of definitions and diagnostic approaches. **Mycoses**, v. 64, n. 9, p. 1002–1014, 1 set. 2021.
- KALIL, A. C.; THOMAS, P. G. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. **Critical care (London, England)**, v. 23, n. 1, p. 258, 19 jul. 2019.
- KANJ, A.; ABDALLAH, N.; SOUBANI, A. O. The spectrum of pulmonary aspergillosis. **Respiratory Medicine**, v. 141, p. 121–131, 1 ago. 2018.
- KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.
- KLUGE, S. et al. Aspergillosis: Emerging risk groups in critically ill patients. **Medical mycology**, v. 60, n. 1, 1 jan. 2021.
- KOEHLER, P. et al. Baseline predictors influencing the prognosis of invasive aspergillosis in adults. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 651–658, ago. 2019.
- KOEHLER, P. et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **Mycoses**, v. 63, n. 6, p. 528–534, 2020.
- KOEHLER, P. et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. e149–e162, 1 jun. 2021.
- KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Thorax**, v. 70, n. 3, p. 270–277, 2015.
- LAHMER, T. et al. Invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia: Results from the prospective AspCOVID-19 study. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3 March, p. 1–16, 2021.
- LAMOTH, F. et al. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 5, p. 633–643, 1 mar. 2012.
- LAMOTH, F. et al. Incidence of invasive pulmonary aspergillosis among critically ill COVID-

- 19 patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 12, p. 1706–1708, 2020.
- LANZARIN, L. D. et al. Conidial heads (Fruiting Bodies) as a hallmark for histopathological diagnosis of angioinvasive aspergillosis. **Autopsy & case reports**, v. 5, n. 4, p. 9–18, dez. 2015.
- LASS-FLÖRL, C. How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis. **Medical mycology**, v. 57, n. Supplement_2, p. S155–S160, 1 abr. 2019.
- LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 8, p. 382–389, ago. 2001.
- LATGÉ, J. P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 1–75, 2019.
- LISS, B. et al. 1,3- β -D-Glucan contamination of common antimicrobials. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 913–915, abr. 2016.
- LOUGHLIN, L. et al. Pulmonary Aspergillosis in patients with suspected ventilator-associated pneumonia in UK ICUs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 8, p. 1125–1132, 2020.
- LUONG, M.-L. et al. Utility of voriconazole therapeutic drug monitoring: a meta-analysis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1786–1799, jul. 2016.
- MAERTENS, J. A. et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10020, p. 760–769, 20 fev. 2016.
- MARR, K. A. et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 3, p. 641–649, 1 ago. 2004.
- MARR, K. A. et al. Aspergillosis Complicating Severe Coronavirus Disease. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 1, p. 18–25, jan. 2021.
- MARR, K. A.; PATTERSON, T.; DENNING, D. Aspergillosis pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 875–894, 2002.
- MARTIN-LOECHES, I. et al. Increased incidence of co-infection in critically ill patients with influenza. **Intensive care medicine**, v. 43, n. 1, p. 48–58, jan. 2017.
- MARTY, F. M. et al. Reactivity of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3450–3453, out. 2006.
- MCCLENNY, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic

- observation and culture: The traditional approach. **Medical Mycology**, v. 43, n. SUPPL.1, 2005.
- MEERSSEMAN, W. et al. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, n. 6, p. 621–625, 15 set. 2004.
- MEERSSEMAN, W. et al. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 2, p. 205–216, 2007.
- MERCIER, T. et al. Point of care aspergillus testing in intensive care patients. **Critical care (London, England)**, v. 24, n. 1, p. 642, 10 nov. 2020.
- METERSKY, M. L. et al. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, maio 2012.
- NASIR, N. et al. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA) in patients admitted with severe COVID-19 pneumonia: An observational study from Pakistan. **Mycoses**, v. 63, n. 8, p. 766–770, 2020.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41, n. 5, p. 654–659, 1 set. 2005.
- PARK, H. S. et al. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 100, p. 161–202, 2017.
- PASQUALOTTO, A. C. et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients by detection of galactomannan in the bronchoalveolar lavage fluid. **Transplantation**, v. 90, n. 3, p. 306–311, 15 ago. 2010.
- PATEL, G.; GREENBERGER, P. A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 40, n. 6, p. 421–424, 2019.
- PATTERSON, T. F. et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. e1–e60, 2016.
- PFEIFFER, C. D.; FINE, J. P.; SAFDAR, N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, n. 10, p. 1417–1427, 15 maio 2006.
- RAPER, K.B., FENNELL, D.I. The genus *Aspergillus*. **Williams and Wilkins, company Baltimore, Maryland**. p.686, 1965.

- SABINO, R. et al. Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. **Medical Mycology**, v. 52, n. 5, p. 517–527, 2014.
- SABINO, R. *Aspergillus* and Health. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, 1 mar. 2022.
- SABINO, R.; SIMÕES, H.; VERÍSSIMO, C. Molecular Detection of *Aspergillus*: Application of a Real-Time PCR Multiplex Assay in Tissue Samples. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 11, 10 jan. 2020.
- SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014.
- SCHAUWVLIEGHE, A. F. A. D. et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 6, n. 10, p. 782–792, 1 out. 2018.
- SCHELENZ, S. et al. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 461–474, abr. 2015.
- SEGAL, B. H. Aspergillosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1870–84., 2009.
- SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.
- SMITH, N. L.; DENNING, D. W. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. **European Respiratory Journal**, v. 37, n. 4, p. 865–872, 2011.
- STEVENS, D. A.; MELIKIAN, G. L. Aspergillosis in the “nonimmunocompromised” host. **Immunological Investigations**, v. 40, n. 7–8, p. 751–766, 2011.
- TACCONE, F. S. et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: Clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2015.
- TEJERINA, E. E. et al. Invasive aspergillosis in critically ill patients: An autopsy study. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 673–679, ago. 2019.
- TRAPAGA M. R. et al.; Anti-*Aspergillus fumigatus* IgG in patients with bronchiectasis and its relationship with clinical outcome. **Archives of Microbiology**, 24;204(12):728, 2022.
- TUDESQ, J. J. et al. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Nonimmunocompromised Hosts. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 540–547, 2019.
- ULLMANN, A. J. et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, p. e1–e38, 2018.
- VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Influenza-associated aspergillosis in critically ill patients.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 196, n. 4, p. 524–527, 2017a.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v.15, n.11, p.661–674, 2017b.

VANDEWOUDE, K. et al. Invasive aspergillosis in critically ill patients: Analysis of risk factors for acquisition and mortality. **Acta Clinica Belgica**, v. 59, n. 5, p. 251–257, 2004.

VENA, A. et al. Therapeutic Drug Monitoring of Antifungal Drugs: Another Tool to Improve Patient Outcome? **Infectious diseases and therapy**, v. 9, n. 1, p. 137–149, mar. 2020.

VERWEIJ, P. E. et al. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1524–1535, 2020.

Wahl, E. F.; Erickson, M. J. Primary Pulmonary Aspergillosis. **Journal of the Medical Association of Georgia**, v.17, p.341–348, 1928.

WALSH, T. J.; GROLL, A. H. Overview: non-fumigatus species of *Aspergillus*: perspectives on emerging pathogens in immunocompromised hosts. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 2, n. 10, p. 1366–1367, out. 2001.

WAUTERS, J. et al. Invasive pulmonary aspergillosis is a frequent complication of critically ill H1N1 patients: a retrospective study. **Intensive care medicine**, v. 38, n. 11, p. 1761–1768, nov. 2012.

WHITE, P. L. et al. A National Strategy to Diagnose Coronavirus Disease 2019-Associated Invasive Fungal Disease in the Intensive Care Unit. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 73, n. 7, p. e1634–e1644, 5 out. 2021.

WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239–1242, 7 abr. 2020.

XAVIER, M. O. et al. Galactomannan detection from piperacillin-tazobactam brands available in the Brazilian market. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 353–355, out. 2009.

XAVIER, M. O. et al. Variability in Galactomannan detection by Platelia *Aspergillus* EIA™ according to the *Aspergillus* species. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao**

Paulo, v. 55, n. 3, p. S0036-46652013000300140, 2013.

YESNER, R., HURWITZ, A. A Report of a Case of Localized Bronchopulmonary Aspergillosis Successfully Treated by Surgery. **Journal of Thoracic Surgery**, v.10, p.310-314, 1950.

ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 28 mar. 2020.

APÊNDICE A

Artigo realizado durante o período do Mestrado e submetido ao periódico *Journal of Medical Mycology* (FI: 3,476) em 14/12/2022

Systemic Aspergillosis Associated with Acute Enterocolitis in Foals

Mariana Rodrigues Trápaga^{1,2}, Vanice Rodrigues Poester^{1,2}, Mariana Andrade Mousquer³,
Rafaela Pinto de Souza³, Leandro Américo Rafael³, Josiane Bonel³, Aryse Martins Melo⁴,
Angelita Gomes Reis³, Renata Osorio de Faria³, David A. Stevens^{5,6}, Carlos Eduardo Wayne
Nogueira³, Melissa Orzechowski Xavier^{1,2}

¹ Laboratory of Mycology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande 96200-400 Rio Grande – RS, Brazil

² Post-graduate Program in Health Sciences, Federal University of Rio Grande 96200-400 Rio Grande – RS, Brazil

³ Hospital of Veterinary Clinics, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ National Institute of Health, Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal.

⁵ California Institute for Medical Research, San Jose, California;

⁶ Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Stanford University Medical School, Stanford, California.

Abstract

Aspergillosis is an uncommon disease in horses, but it can be fatal. We report two cases of systemic aspergillosis in foals that occurred in a short period in the same region of southern Brazil. In addition, a literature review of similar cases was also performed. Risk factors were attributed to an immunodepression by primary enterocolitis and corticosteroid treatment, the damage in the epithelium, and multiple antibacterial treatments, which allowed local fungal proliferation, tissue invasion and spread of infection, leading to death. Since the antemortem diagnosis of aspergillosis in foals is difficult, our report alerts equine veterinarians regarding the importance of suspecting and investigating fungal co-infections in complicated cases of enterocolitis.

Keywords: disseminated aspergillosis; fungal infection; opportunistic diseases; *Aspergillus fumigatus*

Introduction

Enterocolitis is one of the most common clinical disorders in equines, with high rates of mortality [1]. This inflammatory condition is associated with a systemic immunosuppression due to local leukocyte migration, and leads to disruptive damage in the gastrointestinal mucosa [2–4], allowing opportunistic infections. In these conditions, *Aspergillus* spp., a fungal opportunistic pathogen present in the equine environment and the equine gastrointestinal microbiome, can translocate to the bloodstream and cause systemic aspergillosis [2,4].

Aspergillosis is reported as an uncommon disease in horses [5], and *Aspergillus* spp. is mainly associated with guttural pouch infections. *Aspergillus* spp. are a recognized cause of equine recurrent airway obstruction [6]. However, *Aspergillus* can infect lungs, particularly if prior colonization of the respiratory tract or pulmonary fibrosis is pre-existing [7,8], and it can cause a systemic disease which is often fatal [9]. This condition is difficult to confirm, frequently being diagnosed only in post-mortem examinations [10,11], and we suspect that many fatal cases are not investigated at all. Since few data regarding systemic aspergillosis in horses are available in the scientific literature, we describe two fatal cases of enterocolitis associated with systemic aspergillosis in foals diagnosed at a university veterinary hospital in southern Brazil over a period of six months (January and July of 2019). A bibliographic review to search for similar cases is also included.

Case Report 1

A Thoroughbred, eight months old, from a private farm in Bagé city, Rio Grande do Sul, Brazil, was admitted to the veterinary clinical hospital of the Federal University of Pelotas (HCV/UFPEL), with profuse diarrhea, abdominal pain, tachycardia (60 beats per minute), fever (38.9°C), congested mucous membranes and capillary perfusion time of 4 seconds. Total blood count showed hematocrit increase (59.3%), total plasma protein decrease (1.8 mg/dL) and neutrophilic leukocytosis (16,405 cells/ μ L). Abdominal ultrasound revealed distention of small intestinal loops with fluid content, hypomotility and thickening wall, indicating an acute enterocolitis. The foal received fluid therapy and dexamethasone (0.1 mg/kg, IV) for three days and a non-steroid anti-inflammatory drug (flunixin meglumine 1.1 mg/kg, IV, q12h) for the entire treatment period. In addition, aggressive antibiotic therapy with erythromycin (25 mg/kg, PO, q6h) and rifampicin (10 mg/kg, PO, q12h) was given. The foal was unresponsive to the treatment, dying 12 days after admission.

Necropsy showed necrosis in intestinal villi crypts, and dissemination of several whitish nodules with a dense and friable cystic wall in the myocardium, brain, and particularly in the lungs (Figure 1). Histopathology of the myocardium, frontal cortex of brain and lung tissues

showed hyaline septate-branching fungal hyphae (Figure 2). Lung and fecal samples were collected for microbiological exams. *Aspergillus* section *Fumigati* was isolated from lung tissue and *Salmonella* spp. from a fecal sample. Tissues of the brain were sent for virologic examination, and identified the presence of Herpes types 1 and 4 through polymerase chain reaction (PCR).

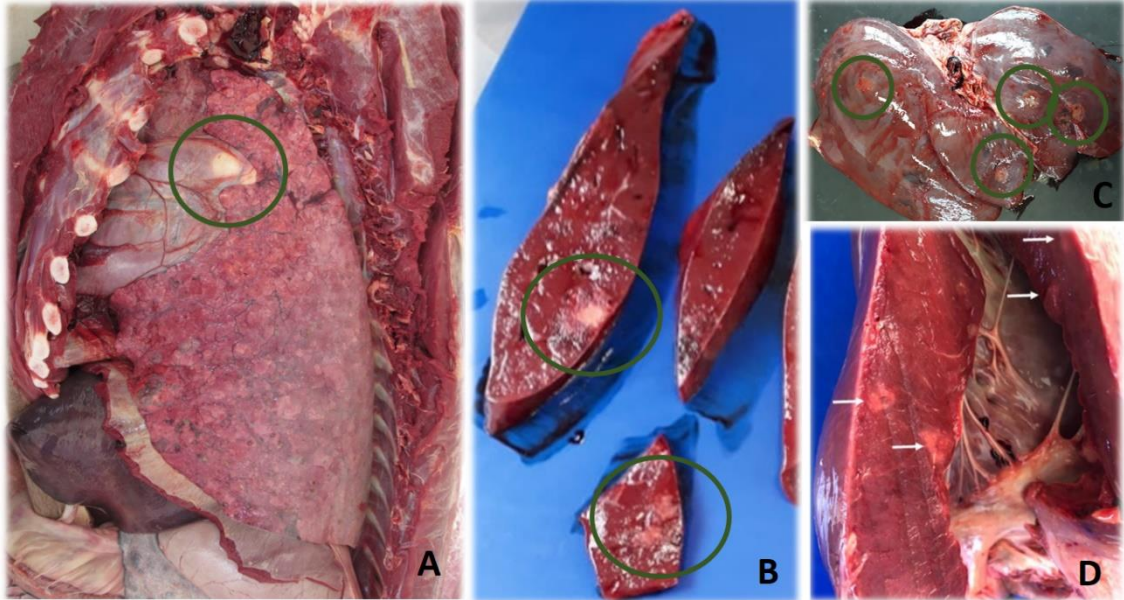


Figure 1. Organs of a thoroughbred foal with enterocolitis associated with systemic aspergillosis showing whitish nodules with a dense and friable cystic wall in the lungs (A), liver (B and C), and myocardium (D).

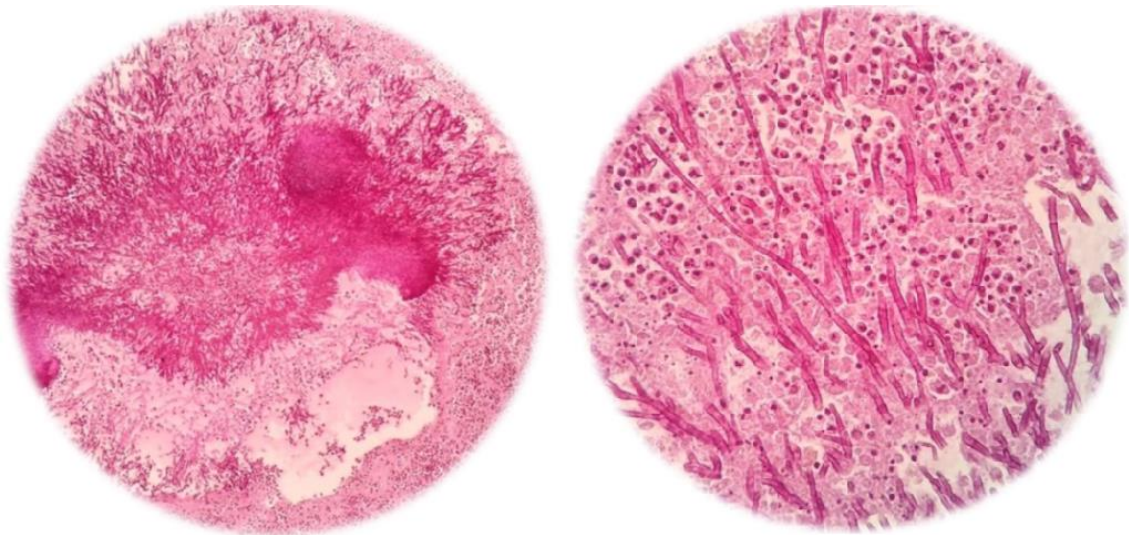


Figure 2. Histopathology of the myocardium, frontal cortex of brain and lung tissues with hyaline septate-branching fungal hyphae stained with eosin hematoxylin.

Case Report 2

A Criollo, eight months old, from another private farm was admitted to the veterinary clinical hospital HCV/UFPEL, with signs of apathy, gastrointestinal hypomotility, tachycardia (84 bpm), congested mucous membrane and capillary perfusion time of 2 seconds. Total blood count showed neutrophilic leukocytosis (35,900 cells/ μ L) and hyperfibrinogenemia (600 mg/dL). Abdominal ultrasound showed distention of small intestinal loops with fluid content. On the second day after admission, the foal showed abnormal respiratory signs such as dyspnea and tachypnea. Thoracic ultrasound showed the presence of discrete hyperechoic reverberation artifacts arising from the pleural line, commonly called “comet tails”, and areas of lung consolidation.

Treatment with procaine penicillin (22,000 IU/kg, IM, q24h, 5 days), metronidazole (15 mg/kg, PO, q8h, 5 days), gentamicin (6.6 mg/kg, IV, q24h), non-steroidal anti-inflammatory agent (flunixin meglumine 1.1 mg/kg, IV, q12h, during 14 days), dimethylsulfoxide (10%, q12 h, IV, 5 days), and omeprazole (4 mg/kg, q24 h, PO) was initiated. After 5 days of treatment, the antibiotic therapy was changed to ceftriaxone (25 mg/kg, IV, q24h). Despite the extensive treatment, without clinical improvement the patient deteriorated and was euthanized.

Necropsy investigation showed hemorrhagic areas with necrosis, and dark disseminated nodules with a yellowish center in the lungs, liver, and intestines (Figure 3). Hyaline septate-branching fungal hyphae were detected at histopathologic examination, and *Aspergillus* section *Fumigati* was isolated from the lung tissue.

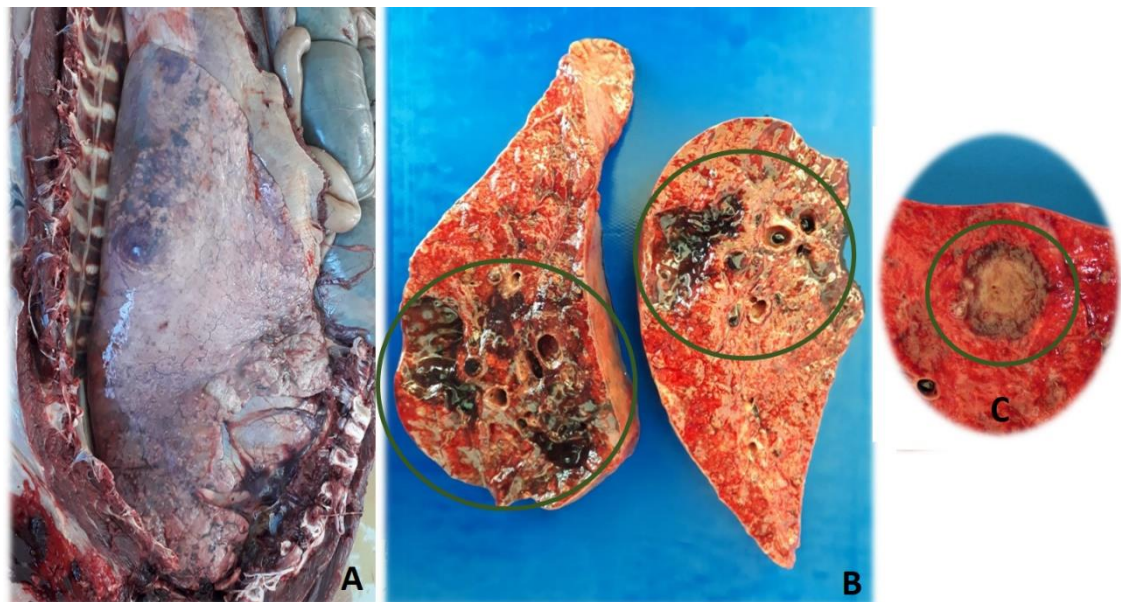


Figure 3: Hemorrhagic areas with necrosis, and dark disseminated nodules with a yellowish center, in lungs.

Aspergillus section *Fumigati* isolates from both foals were submitted to species identification by polymerase chain reaction (PCR) of the calmodulin gene and then sequenced by ACTGene Análises Moleculares Ltd. (Center for Biotechnology, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) [12]. The analysis of the sequences was performed using MEGA software version 10.0.5 and the GenBank database (Bethesda, MD, USA), showing 99% of homology with *Aspergillus fumigatus sensu stricto*.

Discussion

Disseminated aspergillosis is a rare condition in equine clinics, and mainly occurs via inhalation of conidia from the environment [2–4,13,14]. However, we present data from two foals that developed this invasive fungal infection probably through translocation of fungal propagules from the intestinal tract to the bloodstream. These cases occurred in a short period of time in the same geographic region.

Pulmonary aspergillosis in equines has been associated with primary or secondary loss of integrity in the gastrointestinal tract [4,15]. In agreement, the two foals from our report were primarily diagnosed with acute and severe enterocolitis and received aggressive therapy, with prolonged antimicrobials and corticosteroids. These predisposing conditions are defined as known risk factors for an invasive opportunistic infection, including systemic aspergillosis [11,16]. Furthermore, the thoroughbred was diagnosed with Herpes virus types 1 and 4, contributing to the immunosuppression of the patient.

A. fumigatus sensu stricto, identified as the etiological agent of both of our cases, is the most common species associated with mammalian aspergillosis [9,10,17]. Aspergillosis can be a fatal disease with rapid progression and dissemination in horses, without typical clinical signs, which makes antemortem diagnosis difficult [4,11]. Given the ubiquitous and saprophytic characteristics of *Aspergillus* species, to confirm a diagnosis of aspergillosis it is necessary that an *Aspergillus* isolation in culture be associated with a positive serology, positive specific biomarker, and/or a histological evidence of tissue invasion [11].

A bibliographic review was made in the database PubMed with the descriptors (“HORSE” or “EQUINE” or “FOAL” and “ASPERGILLOSIS”), limited to articles in English and excluding those that were not indexed. The search resulted in 96 articles, with 24 selected by title and abstract. Only two of them described cases of disseminated aspergillosis in horses with more than one internal organ infected [16,18]. The majority reported focal aspergillosis cases, including pulmonary infection (n=10) [2,4,13–15,19–23], guttural pouch infection (n=5) [24–28], mycotic aneurysm [29], brain infection [30], mycetoma [31] and keratomycosis [17,32,33].

Similar to our cases, a pulmonary and endocarditis aspergillosis case, with histopathological evidence of thrombosis of pulmonary blood vessels and fungal structures in lungs and heart tissues, and *Aspergillus* spp. cultured from the lungs, was described in a horse previously submitted to surgery for transverse colon impaction [18], also suggesting fungal infection via GI translocation. On the other hand, Headley et al. (2014) described a case of a horse receiving prolonged treatment with antimicrobials and corticosteroids, that died suddenly after neurological manifestations, showing *Aspergillus* spp. structures in the lungs, brain, myocardium, and kidneys on histopathologic examination, without gastrointestinal abnormalities, suggesting inhalation as the route of the fungal infection [16].

Our report contributes to the few studies in the literature describing a fatal systemic fungal disease in horses. We highlight the necessity for equine veterinary clinicians to be aware of the occurrence of opportunistic aspergillosis in foals. It would be desirable to have studies of *Aspergillus* biomarkers, in blood, urine, tracheal wash and bronchoalveolar lavage, antemortem in suspected cases, and reports on efficacious antifungal regimens. The lack of recent studies of fungal systemic diseases in horses draws attention to the impact of these diseases on equine health, and we hope will promote future studies, particularly with prospective investigations.

Acknowledgments: The authors are grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* from the Ministry of Education, Brazil (CAPES - BR), under the CAPES-Print Program - Finance Code 001.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

All authors declare that they have no conflicts of interest pertaining to this work.

References

1. Macías-Rioseco M, Hill AE, Uzal FA. Fatal intestinal inflammatory lesions in equids in California: 710 cases (1990-2013). 2020; 14: 455.
2. Slocombe RF, Slauson DO. Invasive pulmonary aspergillosis of horses: an association with acute enteritis. Vet Pathol. 1988;25(4):277–81.
3. Blomme E, Del Piero F, La Perle KMD, Wilkins PA. Aspergillosis in horses: A review. Equine Vet Educ. 1998;10(2):86–93.
4. Breshears MA, Holbrook TC, Haak CE, York PA. Pulmonary aspergillosis and ischemic distal limb necrosis associated with enteric salmonellosis in a foal. Vet Pathol.

2007;44(2):215–7.

5. Cafarchia C, Figueredo LA, Otranto D. Fungal diseases of horses. *Vet Microbiol.* 2013;167(1–2):215–34.
6. Xavier MO, Nogueira CEW, Meirelles M, Fernandes WR, Andreolla H, Severo LC, et al. Fungi in the respiratory tract of horses with recurrent airway obstruction. *Arq Bras Med Vet E Zootec.* 2014;66(5):1457–63.
7. Dobesova O, Schwarz B, Velde K, Jahn P, Zert Z, Bezdekova B. Guttural pouch mycosis in horses: A retrospective study of 28 cases. *Vet Rec.* dezembro de 2012;171(22):561.
8. Lepage OM, Perron MF, Cadoré JL. The mystery of fungal infection in the guttural pouches. *Vet J.* 2004;168(1):60–4.
9. Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, De Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJG, et al. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: A global health concern with parallels to human disease. *Med Mycol.* 2015;53(8):765–97.
10. Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: Impact on veterinary medicine. *Med Mycol.* 2005;43:71–3.
11. Higgins JC, Pusterla N. Fungal Pneumonia in Horses. *Clin Tech Equine Pract.* 2006;5(3):218–24.
12. Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia.* 2005;97(6):1316–29.
13. Long JR, Mitchell, L. L. Pulmonary aspergillosis in a mare. *Canadian Veterinary Journal.* 1971.
14. Carrasco L, Tarradas MC, Gómez-Villamandos JC, Luque I, Arenas A, M6ndez A. Equine Pulmonary Mycosis due to *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. Vol. 117, *J. Comp. Path.* 1997.
15. Marti-Aguado D, Ballester MP, Bosca-Watts MM. Invasive pulmonary aspergillosis in an immunocompromised patient with severe ulcerative colitis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2017;109(4):317.
16. Headley SA, de Carvalho PH, Cunha Filho LFC, Yamamura AAM, Okano W. Equine Pulmonary Aspergillosis with Encephalitic, Myocardial, and Renal Dissemination. *Mycopathologia.* 2014;177(1–2):129–35.
17. Hendrix DVH, Brooks DE, Smith PJ, Gelatt KN, Miller TR, Whittaker C, et al. Corneal stromal abscesses in the horse: a review of 24 cases. *Equine Vet J.* 1995;27(6):440–7.
18. Pace, LW.; Wirth, NR. Foss RR.; Fales, WH. Endocarditis and pulmonary aspergillosis in a horse. 1994;6:504–6.
19. Hattab J, Vulcano A, D’arezzo S, Verni F, Tiscar PG, Lanteri G, et al. *Aspergillus section fumigati* pneumonia and oxalate nephrosis in a foal. *Pathogens.* 2021;10(9):1–7.

20. Johnson PJ, Moore LA, Mrad DR, Turk JR, Wilson DA. Sudden death of two horses associated with pulmonary aspergillosis. *Vet Rec.* 1999;145(1):16–20.
21. Thirion-Delalande C, Guillot J, Jensen HE, Crespeau FL, Bernex F. Disseminated Acute Concomitant Aspergillosis and Mucormycosis in a Pony. *J. Vet. Med.* 2005; 52:121–124.
22. Carrasco' L, Mendez' A, Jensen' HE. Chronic bronchopulmonary aspergillosis in a horse with Cushing's syndrome Chronische bronchopulmonale Aspergillose bei einem Pferd mit Cushing-Syndrom. Vol. 39, mycoses. 1996 p. 443–7.
23. Schar DL, Sage AM, Hayden DW, Wilson JH. What Is Your Diagnosis? Vol. 224, JAVMA. 2004.
24. Cabañes FJ. Guttural pouch mycosis, sympathy for *Aspergillus nidulans*. *Rev Iberoam Micol.* 1º de julho de 2020;37(3–4):75–6.
25. Ludwig A, Gatineau S, Reynaud MC, Cadoré JL, Bourdoiseau G. Fungal isolation and identification in 21 cases of guttural pouch mycosis in horses (1998-2002). *Vet J.* 2005;169(3):457–61.
26. Rawlinson RJ, Jones RT. Guttural pouch mycosis in two horses. *Australian Veterinary Journal.* 1978; 54.
27. Millar H. Guttural pouch mycosis in a 6-month-old filly. Vol. 47, *Can Vet J.* 2006 p. 259.
28. Kipar A, Frese K. Hypoglossal Neuritis with Associated Lingual Hemiplegia Secondary to Guttural Pouch Mycosis. Vol. 30, *Palh ol.* 1993 p. 574–6.
29. Okamoto M, Kamitani M, Tunoda N, Tagami M, Nagamine N, Kawata K, et al. Mycotic aneurysm in the aortic arch of a horse associated with invasive aspergillosis. 2007.
30. Tunev SS, Ehrhart EJ, Jensen HE, Foreman JH, Richter RA, Messick JB. Necrotizing Mycotic Vasculitis with Cerebral Infarction Caused by *Aspergillus niger* in a Horse with Acute Typhlocolitis. Vol. 36, *Brief Communications and Case Reports Vet Pathol.* 1999 p. 347–51.
31. Keegan, KG; Dillavou, CL; Turnquist, SE; Fales, WH. Subcutaneous mycetoma-like granuloma in a horse caused by *Aspergillus versicolor*. *J Vet Diagn Invest.* 1995;7:564–7.
32. Sansom J, Featherstone H, Barnett KC. Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. *Veterinary Record.* 2005; 156:13-17
33. Wada S, Hobo S, Ode H, Niwa H, Moriyama H. Equine keratomycosis in Japan. *Vet Ophthalmol.* janeiro de 2013;16(1):1–9.