

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Alexandre de Almeida Monteiro

**Avaliação do efeito da hemólise no
teste de quantificação da
galactomanana.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2016**

Alexandre de Almeida Monteiro

Avaliação do efeito da hemólise no teste de quantificação da galactomanana.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto

**Porto Alegre
2016**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos, colegas de trabalho e laboratório, que, direta ou indiretamente, me auxiliaram nesta etapa.

A todos os voluntários que se propuseram doar não só o sangue, mas alguns minutos de suas vidas corridas, permitindo a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, irmãos e familiares pela força. Passamos por momentos difíceis, mas com união superamos cada um deles.

Um agradecimento especial a minha esposa Marcela Maciel Miranda, pela paciência, por estar sempre ao meu lado nesta caminhada, e por me presentear com o bem mais precioso que alguém pode querer (meu filho Murilo de Miranda Monteiro).

Por fim, ao meu orientador Alessandro Pasqualotto, que permitiu que este sonho se realizasse, com muita paciência, atenção e dedicação ao me conduzir na busca do conhecimento. Serei sempre grato!

Muito obrigado a todos!

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Doenças Fúngicas	1
1.1.1. Aspergilose	2
1.1.1.1. Principais formas de Aspergilose	3
1.1.1.2. Epidemiologia	5
1.1.1.3. Diagnóstico da Aspergilose	6
1.2. Importância das variáveis pré-analíticas em exames laboratoriais	14
1.2.1. Temperatura e tempo de armazenamento	15
1.2.2. Hemólise	15
1.2.3. Hiperbilirrubinemia	16
1.3. Referências bibliográficas	18
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Artigo científico redigido em inglês	27
4. Considerações finais	47
5. Anexos	48
Anexo I – Parecer consubstanciado CEP ISCMPA/UFCSPA	48
Anexo II – Normas de redação do artigo	52
Anexo III – Banner do Congresso Brasileiro de Infectologia 2015	60

Lista de abreviaturas utilizadas

TC: *Tomografia computadorizada*

FDA: *Food and Drug Administration*

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

AI: *Aspergilose Invasiva*

GM: *Galactomanana*

GM-ODI: *Índices de densidade óptica da galactomanana*

AIDS: *Síndrome da Imunodeficiência Adquirida*

DNA: *Ácido desoxirribonucleico*

LDH: *Lactato desidrogenase*

BT: *Bilirrubina Total*

Hb: *Hemoglobina*

TA: *Temperatura Ambiente*

APNC: *Aspergilose pulmonar necrosante crônica*

LBA: *Lavado broncoalveolar*

TC: *Tomografia computadorizada*

IgE: *Imunoglobulina E*

PCR: *Reação em cadeia da polimerase*

Re: *Refrigerada*

ABPA: *Aspergilose bronco-pulmonar alérgica*

rRNA: *Ácido ribonucleico ribossomal*

ITS: *internally transcribed spacer*

Resumo da Dissertação

Introdução: A dosagem de galactomanana (GM) sérica tem sido o pilar central para o diagnóstico presuntivo de aspergilose invasiva (AI), servindo como guia para a terapia antifúngica preemptiva. No entanto, pouco se sabe sobre as variáveis pré-analíticas que possam interferir em seus resultados.

Objetivos: Avaliar o impacto das variáveis pré-analíticas temperatura e tempo de armazenamento de amostras clínicas nos resultados do teste comercial Platelia *Aspergillus*. Ainda, buscou-se verificar o efeito da hemólise e hiperbilirrubinemia sobre o teste.

Material e Métodos: Foram obtidas amostras de soro (14 ml) de 42 voluntários adultos saudáveis. Sete tubos de coleta foram obtidos de cada indivíduo, para a realização das seguintes análises, visando documentar a presença de hemólise: GM, bilirrubina total (BT), lactato desidrogenase (LDH) e hemoglobina (Hb). As análises foram realizadas em diferentes momentos: imediatamente e após 48h, 72h e 96h de armazenamento, utilizando-se duas faixas de temperatura – refrigerado (Re) e temperatura ambiente (TA). A fim de determinar se as mesmas alterações ocorreriam em amostras sabidamente positivas, contaminou-se amostras de 21 voluntários sadios com 50 µl de uma mistura de controles positivos e cultura de cepa-padrão pura de *A. fumigatus*. Para avaliar o efeito de altas concentrações de BT e Hb em amostras negativas e positivas para GM, realizou-se duas curvas de concentração, utilizando padrões comerciais destes analitos.

Resultados: Em nosso estudo não encontramos nenhuma influência do tempo de armazenamento (até 96h) e temperaturas (Re e TA) sobre os resultados

GM. No entanto, a BT (coeficiente de correlação de Spearman 0,657; $p = 0,020$) e Hb (coeficiente de correlação de Spearman -0,886; $p = <0,0001$) influenciaram nas leituras GM em amostras sabidamente positivas para GM.

Conclusões: Conclui-se que o teste Platelia GM não sofre grande influência de variáveis pré-analíticas, tais como condições de armazenamento, hemólise e icterícia. No entanto, excesso de Hb e BT nas amostras podem interferir nos resultados de GM positivas (altas concentrações de hemoglobina podem aumentar os índices de densidade óptica da galactomanana - GM-ODI - em até 28% e altas concentrações de bilirrubina podem reduzir os GM-ODI em até 48,9%). Estes resultados podem facilitar a logística e a implementação de procedimentos operacionais padrão em laboratórios clínicos.

Palavras-chave: galactomanana, aspergilose, hemólise, imunoensaios.

1. Introdução

1.1 Doenças fúngicas

As doenças fúngicas cresceram em importância na prática clínica ao longo das últimas décadas. A causa para este fenômeno é multifatorial (Bouchara e cols., 1995; Blanco e cols., 1998; Latgé, 1999; Latgé, 2001; Rementería e cols., 2005), sendo que um aumento na proporção de indivíduos sob risco está ocorrendo, devido a variados regimes de imunossupressão (uso de drogas citotóxicas, terapia com corticosteroides e transplante de medula e órgãos sólidos). Com os avanços ocorridos na área médica, como o surgimento de novas drogas (anticâncer, antirretrovirais, antibióticos), vacinas e novos métodos diagnósticos, muitos pacientes criticamente enfermos acabam sobrevivendo por mais tempo, aumentando, desta maneira, o risco de doenças fúngicas nestes doentes. A emergência de síndromes associadas a estados de imunodepressão, como a *Síndrome da Imunodeficiência Adquirida* (AIDS), também resultou em um aumento na incidência das infecções causadas por fungos (Slavin e cols., 2004; Richardson, 2005; Perloth e cols., 2007).

Os fungos são ubíquos no ambiente, existindo no solo, na água e em restos orgânicos. Mais de 300 espécies de fungos já foram documentadas como causadoras de doenças em humanos. No entanto, apenas 90% das infecções são atribuídas a poucas dezenas de espécies (Taylor e cols., 2001; Mitchel, 2000).

Entre todas as doenças fúngicas, a aspergilose é a infecção oportunista mais comum em todo o mundo, sendo provocada por espécies do gênero *Aspergillus*. Entre elas, encontramos *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A.*

terréus, além da mais comum, o *A. fumigatus* (Alastruey-Izquierdo e cols., 2013; Snelders e cols., 2012).

1.1.1 Aspergilose

Existem mais de 200 espécies de *Aspergillus* dentro da família Aspergillaceae e, entre estas, apenas 34 são apontadas como causadoras de doenças em humanos (Barnes e Marr, 2006). O termo aspergilose engloba todas as doenças provocadas por fungos do gênero *Aspergillus* (Oliveira, 2014).

Ao crescer em matéria orgânica, os *Aspergillus* spp. apresentam conídios que se destacam e podem ser levados pelo ar. Os conídios inalados entram pela árvore respiratória e germinam, originando hifas nos pulmões, podendo invadir outros tecidos ou órgãos (Raja e Singh, 2006). No entanto, a capacidade de invasão dos esporos vai depender da virulência do fungo, das defesas do hospedeiro ou ainda das circunstâncias da exposição (Richardson e Warnock, 2003).

Entre todas as espécies patogênicas ao homem, *A. fumigatus* responde por aproximadamente 65% das infecções invasivas, sendo a espécie mais encontrada em infecções pulmonares. Já as demais espécies são causas menos frequentes de infecções invasivas e pulmonares (Perfect e cols., 2001; Burgos e cols., 2008; Jiang e cols., 2013).

Entre todas as condições clínicas oriundas das infecções por *Aspergillus*, podemos destacar quatro síndromes: aspergiloma, reações de hipersensibilidade (como a aspergilose broncopulmonar alérgica), aspergilose

pulmonar necrosante crônica e AI (Franquet e cols., 2001; Kousha e cols., 2011).

1.1.1.1 Principais formas de Aspergilose

Aspergiloma

O aspergiloma é referido como o desenvolvimento do fungo dentro de uma cavidade preexistente e em comunicação com a árvore respiratória superior, permitindo, por um lado, a chegada dos esporos, e, por outro, o arejamento da cavidade (Sidrim e cols., 2012). Nesta cavidade, o fungo encontra condições nutricionais favoráveis, as quais permitirão o crescimento fúngico, originando quantidades abundantes de hifas e até mesmo cabeças aspergilaes. Estas podem permanecer durante anos nas paredes das cavidades que as contêm, não apresentando nenhuma interferência para as funções pulmonares do paciente (Hope e cols., 2005; Kousha e cols., 2011; Richardson e Warnock, 2003; Sidrim e cols., 2012).

Aspergilose bronco-pulmonar alérgica (ABPA)

A ABPA é definida como uma forma de hipersensibilidade pulmonar, associada à destruição das vias aéreas, em resposta ao *Aspergillus* spp. Nesta, ocorre o desenvolvimento de anticorpos do tipo Imunoglobulina E (IgE) contra os antígenos de superfície dos conídios. Caracteriza-se por episódios de asma aguda responsiva a corticosteroide ou por asma corticoide dependente, com sintomas não usuais de febre e hemoptise, com destruição da via aérea. Quando tratada inadequadamente, o dano pulmonar permanente pode

progredir para fibrose (Barnes e Marr, 2006; Walsh e cols, 2008; Richardson e Warnock, 2003).

A ABPA está presente em 2% a 28% dos pacientes asmáticos e em 2% a 15% dos portadores de fibrose cística (Vlahakis e Aksamit, 2001). Esta é caracterizada por asma com dispneia contínua, febre, infiltrados pulmonares duráveis e excesso de eosinófilos, tanto no sangue como na expectoração (Walsh e cols., 2008). Esta forma de aspergilose apresenta um prognóstico reservado, dada a progressiva perturbação da função respiratória (Sidrim e cols., 2004; Walsh e cols., 2008).

Aspergilose pulmonar necrosante crônica (APNC)

A APNC é um processo indolor, de cavitação e infeccioso do parênquima pulmonar secundário ao local de invasão dos *Aspergillus*, geralmente *A. fumigatus* (Saraceno e cols., 1997). Em contraste com a AI, a APNC possui um desenvolvimento lento e progressivo, que pode durar semanas ou meses, e a invasão vascular ou disseminação para outros órgãos é incomum. Esta síndrome é rara, e a literatura disponível é baseada em poucos relatos de casos (Stojnic e cols., 2014; Kim e cols., 2000; Saraceno e cols., 1997; Denning e cols., 2003).

Aspergilose invasiva (AI)

Entre todas as formas de infecção por *Aspergillus*, a AI pode ser considerada a mais importante. Ela é uma das maiores causas de mortalidade em pacientes imunossuprimidos, pois estes são pouco capazes de desenvolver uma resposta imune humoral satisfatória (Hope e cols., 2005). Desta forma, a

detecção precoce é fundamental na aplicação terapêutica adequada (Meersseman e cols., 2007; Freifield e cols., 2011; Salman e cols., 2011; Torelli e cols., 2011).

A AI é caracterizada pelo desenvolvimento de formas aspergiliares no parênquima pulmonar de pacientes imunodeprimidos (Dagenais e Keller, 2009; Kousha e cols., 2011; Raja e Singh, 2006). O fungo se espalha do local da infecção primária para outros tecidos, sem considerar os limites teciduais. As hifas possuem a capacidade de invadir o lúmen e a parede dos vasos sanguíneos, podendo provocar trombose, infarto, necrose e hemorragias (Richardson e Warnock, 2003).

A precocidade do tratamento antifúngico é um fator prognóstico importante para AI (Caillot e cols., 2001). Um dos principais fatores para as altas taxas de mortalidade (30 a 50%) (Herbrecht e cols., 2002; Hachem e cols., 2009; Lortholary e cols., 2011) é a dificuldade de fazer um diagnóstico preciso, confiável e rápido (Desoubeaux e cols., 2014).

1.1.1.2 Epidemiologia

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam distribuição mundial, com algumas espécies ocorrendo em maior número em países de clima quente e subtropical (Guarro e cols., 2010).

A inalação de esporos de *Aspergillus* é o modo normal de infecção em seres humanos. O período de incubação é desconhecido. Menos frequentemente, a infecção segue a implantação traumática de esporos como na infecção da córnea, ou inoculação direta de pensos contaminados. A inalação de aerossóis de água contaminada durante o banho do paciente

também tem sido sugerido como uma potencial fonte de infecção (Richardson e Warnock, 2003).

Um estudo prospectivo com receptores de transplantes, realizado entre 2001 e 2006, verificou que a AI foi o tipo mais comum de infecção fúngica entre os receptores de transplante de células-tronco (Kontoyiannis e cols., 2012) e foi o segundo mais comum tipo de infecção fúngica entre os receptores de transplantes de órgãos sólidos (Pappas e cols., 2010).

1.1.1.3 Diagnóstico da Aspergilose

A aspergilose é uma doença de diagnóstico difícil, por vezes tardio, fatores estes que acabam dificultando o sucesso do tratamento (Garcia e cols., 2001; Tell, 2005). Embora existam variados métodos disponíveis, a utilização de um único teste muitas vezes não é o suficiente para um diagnóstico definitivo. Desta forma, o diagnóstico de aspergilose exige prudência ao se avaliar o isolamento de uma espécie de *Aspergillus* das amostras clínicas (Murray e cols., 2009).

Exame direto

O diagnóstico laboratorial da infecção fúngica é muito dependente da coleta adequada da amostra. O exame microscópico direto de fragmentos teciduais e amostras clínicas é considerado um dos mais rápidos para o diagnóstico das infecções fúngicas, mas podem ocorrer resultados falso-positivo e falso-negativo (Murray e cols., 2009).

O exame direto consiste em avaliar a amostra clínica microscopicamente entre a lâmina e a lamínula, utilizando corantes para a visualização de

estruturas fúngicas (Fukuda e cols., 2003; Maertens e cols., 2001). Fragmentos teciduais, escarro e lavado broncoalveolar (LBA) podem ser analisados através da adição de uma solução 20% de hidróxido de potássio, com ou sem corantes (Xavier e cols., 2009). A microscopia é menos sensível que a cultura, sendo que um exame direto negativo não exclui a possibilidade de uma infecção fúngica (Murray e cols., 2009).

Cultivo

O diagnóstico microbiológico da AI foi, durante muitos anos, embasado na identificação do crescimento desse fungo em cultura. No entanto, sabe-se que este método apresenta pouca sensibilidade e não permite distinguir entre infecção e colonização (Zmeili e Soubani, 2007; Houbraken e cols., 2010; Torelli e cols., 2011; Hadrich e cols., 2011).

Nas culturas de secreções respiratórias, a recuperação de *Aspergillus* apresenta sensibilidade diagnóstica muito baixa: para escarro (8-34%) e para LBA (45-62%) dos pacientes com AI, respectivamente. Cultivos de sangue, líquor e medula óssea raramente são positivos para *Aspergillus* spp. (Xavier e cols., 2009). Apesar disso, a cultura, juntamente com a detecção histopatológica do fungo em amostras de biópsia, constituem os métodos padrão ouro para o diagnóstico da infecção por *Aspergillus* (Herbrecht e cols., 2002).

Segundo Horvath e Dummer (1996), as culturas de amostras respiratórias têm um baixo valor preditivo positivo (72%), podendo diminuir ainda mais em pacientes que estão recebendo agentes antifúngicos (Perfect e cols., 2001; Simoneau e cols., 2005). Outra desvantagem das culturas é o

atraso na identificação das espécies, especialmente aqueles fungos que apresentam esporulação lenta, o que pode retardar a seleção do antifúngico apropriado (Balajee e cols., 2009).

Por serem fungos anemófilos e ubíquos, a interpretação do cultivo micológico deve ser realizada com cautela, sem se descartar a hipótese de haver uma contaminação da amostra, nem de ser o verdadeiro (Xavier e cols., 2009). Nesses casos o diagnóstico definitivo requer a associação de outros exames, como o quadro clínico do paciente, a histopatologia e a sorologia (Badiie e Alborzi, 2010).

Radiologia

Quando a visualização direta do fungo e das lesões não é possível, podem ser usados exames radiográficos e tomografia computadorizada (TC). No entanto, os exames de imagens podem apresentar alterações que devem ser correlacionadas com o quadro clínico e exames laboratoriais (cultura e sorologia) (Richardson e Johnson, 2000).

O diagnóstico da AI através da radiologia é de difícil realização, pois não existe um tipo específico de lesão que caracterize esta patologia, podendo ainda ser confundida com outras patologias, como o câncer (Silva, 2010). Desta forma, nos últimos anos, a TC de alta resolução tornou-se uma importante ferramenta diagnóstica em pacientes com doença fúngica, onde a observação de microcalcificações e imagem de densidade metálica no interior dos seios da face podem ser consideradas como sugestivas de doença fúngica (Munõz e cols., 2006)

Histopatologia

O exame histopatológico, demonstrando o agente fúngico nos tecidos, é fundamental para realizarmos o diagnóstico de micoses oportunistas, dando embasamento para o exame de cultivo, provando que o isolado fúngico não corresponde a um contaminante. A associação da cultura com a histopatologia é geralmente considerada o padrão-ouro de diagnóstico nas micoses oportunistas (Xavier e cols., 2009), nas quais ocorre a demonstração de invasão tecidual pelo microrganismo (Ascioglu e cols., 2002; Hachem e cols., 2006).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Diversos testes baseados na técnica de PCR foram propostos para o diagnóstico precoce da infecção invasiva por *Aspergillus* spp. (Aguirre e cols., 2004; Henry e cols., 2000), a fim de melhorar o prognóstico da AI em pacientes de alto risco (Maertens e cols., 2001; Buchheidt e cols., 2001). A PCR apresenta um excelente desempenho, chegando a ser 19,4 vezes mais sensível que a cultura e minimizando, desta forma, a quantidade de resultados falsos-positivos no diagnóstico da AI (Badiie e Alborzi, 2010).

Os alvos para a amplificação incluem o *Ácido desoxirribonucleico* (DNA) mitocondrial, o gene 18S no *Ácido ribonucleico ribossomal* (rRNA) e a região ITS (*internally transcribed spacer*) do rRNA (Ferns, 2006; Hebart e cols., 2000). Desta forma, PCR em tempo real possui como vantagens práticas uma combinação de velocidade, simplicidade, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (White e Barnes, 2010).

Diagnóstico imunológico

Testes de diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos são fundamentais para o diagnóstico de algumas doenças fúngicas. Desta forma, os testes para a detecção de antígenos e anticorpos se tornam cada vez mais importantes, melhorando o prognóstico destes doentes e também fornecendo um meio de monitorização da doença (Murray e cols., 2009).

Entre os principais métodos imunológicos para o diagnóstico da AI estão a detecção de componentes da parede celular fúngica (antígenos de GM e 1,3- β -D-glucano), os quais são antígenos circulantes, podendo ser detectados no sangue de pacientes, sendo extremamente úteis no diagnóstico. Entre estes, o teste de GM apresenta destacado desempenho e é amplamente utilizado como uma evidência indireta da infecção por *Aspergillus* (Marr e cols., 2005).

Detecção de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana

A glucana é um componente da parede celular fúngica. A (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana é liberada durante a infecção e pode ser detectada no plasma de pacientes com várias infecções fúngicas (candidíase, aspergilose e pneumocistose) (Hope e cols., 2005). Já que o homem carece de glucanases para degradá-la, assim, sua eliminação é muito lenta. Portanto, um teste positivo pode ser usado como marcador de infecção fúngica, mas não permite identificar a espécie (Barnes e Marr, 2006; Walsh e cols., 2008).

Teste de galactomanana por Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) sanduíche

A GM é um polissacarídeo termoestável e hidrossolúvel, que compõe a parede celular de diversos fungos, especialmente os do gênero *Aspergillus*. Após sua descoberta, a GM tem sido muito utilizada como um biomarcador para a presença de *Aspergillus* em diversas amostras clínicas, como soro, urina, líquido e líquido pericárdico (Aquino e cols., 2007). Estes antígenos circulantes termoestáveis são libertados durante a fase de crescimento do fungo e a invasão de tecidos; assim, infere-se que pacientes sob risco de AI que possuam teste de GM positivo tenham maior chance de verdadeiramente terem AI, ao invés de colonização fúngica (Bardalaye e Nordin, 1977).

O teste de GM está disponível na Europa desde a década de 90, sendo que foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso nos Estados Unidos em 2003 (Wheat, 2005). Para seu melhor desempenho, recomenda-se que o teste seja realizado de forma seriada. Desta forma, a GM antecipa o diagnóstico de AI em 6-14 dias em indivíduos neutropênicos (Singh, 2005).

O teste GM consiste em um ELISA sanduíche, o qual utiliza um anticorpo monoclonal de rato (IgM EB-A2), que reconhece os epítomos β (1,5) galactofuranose da molécula de galactomanana e requer ao menos quatro destes epítomos livres para efetuar sua ligação e formar o complexo antígeno-anticorpo (Stynen e cols., 1992; Mennink-Kersten e cols., 2004).

Esta metodologia está disponível comercialmente (Platelia *Aspergillus* Ag; Bio-Rad, Hercules, CA), e é capaz de detectar baixas concentrações do antígeno fúngico em amostras clínicas (0,5-1 ng/mL) (Von Eiff e cols., 1995;

Quindós, 2006; Aquino e cols., 2007). Com base na cinética da infecção fúngica *in vivo*, somente quantidades muito limitadas (nanogramas) de antígeno galactomanana e de DNA fúngico entram na corrente sanguínea vindos do sítio primário da infecção, usualmente os pulmões. Este teste fornece resultados rápidos (aproximadamente 3 horas), e encontra-se validado como ferramenta diagnóstica para amostras de soro de pacientes neutropênicos. Em pacientes com AI, a GM pode ser detectada tanto no soro, como no lavado broncoalveolar, na urina, no líquido e no líquido pericárdico, porém o ensaio disponível não foi tão bem estudado para esses espécimes clínicos (Upton e cols., 2005; Quindós, 2006).

Quando associada à TC de alta resolução, a GM tem sido o pilar central para o diagnóstico presuntivo de AI, servindo como guia para a terapia antifúngica preemptiva (Walsh e cols., 2008). Devido a provável liberação intermitente do antígeno, o teste deve ser realizado ao menos duas vezes por semana, podendo-se haver maior presunção diagnóstica ao apresentar resultados positivos em pelo menos duas amostras consecutivas. (Upton e cols., 2005; Aquino e cols., 2007; Walsh e cols., 2008). O ensaio da GM permite um diagnóstico precoce de modo mais fácil e rápido, antecipando-se à sintomatologia clínica, e por vezes às imagens radiológicas, permitindo uma intervenção mais precoce do que aquela realizada com tratamento empírico antifúngico (Quindós, 2006).

O ponto negativo do teste da GM disponível comercialmente (Platelia® *Aspergillus*) é o elevado índice de resultados falso-positivos (5-14%) (Sigh e cols., 2005). Esse fato tem sido observado, sobretudo em indivíduos transplantados de medula óssea, e em indivíduos neutropênicos (Burns e

Yoshikawa, 2002; Lippi e cols., 2005; Rother e cols., 2005). Resultados falso-positivos ocorrem amiúde devido a desenvolvimento da doença enxerto *versus* hospedeiro, mucosite decorrente do uso de agentes quimioterápicos citotóxicos (Verweij e cols., 1995), presença de anticorpos autorreativos, infecção por outros fungos como os dos gêneros *Penicillium* e *Paecilomyces*, transfusões sanguíneas, uso de antibióticos de origem fúngica e contaminação laboratorial (Verweij e cols., 1995; Hamaki e cols., 2001; Burns e Yoshikawa, 2002; Kwak e cols., 2004; Singh e cols., 2005; Ismail e cols., 2005; Rother e cols., 2005; Tanriover e cols., 2005; Aubry e cols., 2006; El Saleeb e cols., 2007; Mikulska e cols., 2012; Barton e cols., 2013).

Segundo Aquino e cols. (2007), o teste de GM apresenta uma taxa de resultados falso-negativos entre 8 e 10% e está relacionada a quadros de encapsulação da infecção, presença de anticorpos anti-*Aspergillus* formando imunocomplexos, os quais impedem a ligação do antígeno no anticorpo IgM EB-A2, ou exposição a agentes antifúngicos com ação contra *Aspergillus* (como no caso de profilaxia).

Quanto à sensibilidade e especificidade de GM no soro, estima-se que estas sejam de 79% e 81-86%, respectivamente, quando se utiliza índice de densidade óptica de 0,5 como o ponto de corte para a positividade (Pfeiffer e cols., 2006; Leeflang e cols., 2008). Especificamente, o tratamento prévio de antibióticos beta-lactâmicos (de origem fúngica) diminui a especificidade do teste, enquanto que um regime de antifúngico diminui a sua sensibilidade (Hachem e cols., 2009).

Analisando as possíveis limitações do ensaio GM, pouca atenção tem sido dada para as etapas de preparação pré-analíticas do ensaio, levando a conclusões imprecisas ou errôneas em estudos anteriores (Vergidis, 2014).

1.2 Importância das variáveis pré-analíticas em exames laboratoriais

O processamento laboratorial de uma amostra é constituído por uma sequência de procedimentos, que começa com a prescrição dos exames por um médico, e termina com a interpretação - também por médicos - dos resultados do exame (Lima-Oliveira e cols., 2009). Estes procedimentos são subdivididos em três fases: fase pré-analítica, analítica e pós-analítica (Da Rin, 2009; Guder, 2014). As variáveis pré-analíticas estão intrinsecamente relacionadas ao desempenho de testes laboratoriais. Os erros nesta fase são os mais comuns, correspondendo por 46-68% de todos os erros (Plebani, 2006).

Erros pré-analíticos, devido a substâncias interferentes endógenos são, talvez, uma das causas mais comuns de erros que ocorrem em testes de laboratório. As substâncias interferentes endógenos podem causar não apenas a interferência espectral, mas também interferências químicas em alguns ensaios. (Dasgupta e Sepulveda, 2013)

A hemólise é um exemplo importante, uma vez que esta é provocada principalmente pela manipulação inadequada durante a coleta/processamento das amostras (Lippi, 2005), tal como o uso prolongado de estase venosa (Burns e Yoshikawa, 2002), atraso de separação de sangue a partir do soro (Lippi, 2005) e de coleta de sangue por meio de cateteres intravenosos (Grant, 2003).

1.2.1 Temperatura e tempo de armazenamento

O conhecimento sobre o tempo de estabilidade das amostras é fundamental para o processamento correto destas, principalmente para laboratórios que enviam suas amostras para laboratórios de apoio em outros estados. Existem poucos estudos publicados sobre a estabilidade dos analitos, onde há um atraso antes da centrifugação. Outros estudos examinaram a estabilidade de vários analitos no sangue total, no entanto, as condições a que as amostras foram expostas têm sido geralmente dentro dos limites definidos pelo fabricante (Tanner e cols., 2008).

1.2.2 Hemólise

A hemólise é definida como o rompimento da membrana da hemácia, causando a liberação da Hb e de outros componentes intracelulares para o plasma. Este quadro responde por quase 60% dos espécimes rejeitados em laboratórios, podendo representar até 3% de todas as amostras laboratoriais (Kroll e Elin, 1994; Burns e Yoshikaw, 2002; Lippi e cols., 2005; Ismail e cols., 2005; Oren e cols., 2012).

A hemólise pode ocorrer tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A hemólise *in vivo* sugere uma condição clínico-patológica, enquanto que *in vitro* representa erros no procedimento de coleta, processamento, transporte ou armazenamento da amostra (Burns e Yoshikawa, 2002; Ismail e cols., 2005; Lippi e cols., 2005; Rother e cols., 2005). Ela é a condição mais indesejável e comum de interferência nos testes clínico-laboratoriais, pois influencia a precisão e a confiabilidade desses testes de diversas formas. A Hb livre, por exemplo, apresenta alta absorbância em comprimentos de onda que variam entre 415

nm e 570 nm. Dessa forma, a sua liberação como resultado da ocorrência de lise dos eritrócitos, provoca elevação aparente na concentração dos analitos medidos nessa escala de comprimento de onda, devido ao aumento da absorvância medida dessas amostras (Burns e Yoshikawa, 2002; Ismail e cols., 2005; Lippi e cols., 2005; Rother e cols., 2005).

A Hb contém outros componentes que também podem interagir ou competir com os reagentes do ensaio, bem como elevar a quantidade do analito dosado, tais como proteínas estruturais, enzimas, lipídios e carboidratos presentes no plasma ou soro analisado (Lippi e cols., 2005).

1.2.3 Hiperbilirrubinemia

As concentrações elevadas de bilirrubina são outra fonte de interferência endógena. Tais aumentos podem ser encontrados em uma variedade de condições, incluindo a doença hepática aguda ou crônica, cirrose biliar, alcoolismo ou como uma resposta fisiológica a vários fármacos (Kroll e McCudden, 2013).

A bilirrubina absorve luz entre 340 nm e 500 nm, podendo elevar as leituras de absorvância de procedimentos que usam espectrofotometria. Além disso, a bilirrubina pode interferir em alguns testes, agindo como uma substância redutora. Os ensaios que utilizam reações oxidase/peroxidase podem apresentar resultados mais baixos porque bilirrubina reage com o H_2O_2 , formado no sistema de ensaio (Dasgupta e Sepulveda, 2013).

Hiperbilirrubinemia ocorre em 20% das amostras de pacientes hospitalizados (Glick e cols., 1989). A bilirrubina se origina a partir da degradação da hemoglobina e é considerada uma molécula tóxica. Esta pode

atuar *in vitro*, inibindo as enzimas hidrolíticas e a desidrogenase (Dasgupta e Sepulveda, 2013).

A bilirrubina pode interferir em ensaios através de dois mecanismos diferentes, químico e espectral. A interferência espectral ocorre porque bilirrubina tem dois picos de absorção em um comprimento de onda de 400 nm e 540 nm. Qualquer teste que tenha absorvância nestes comprimentos de onda, ou próximo destes, podem estar sujeitos a interferências (Kroll e McCudden, 2013).

Já a interferência através de mecanismos químicos ocorre devido à sua interação com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Desta forma, a BT pode causar interferência em métodos que utilizam peroxidase, sendo um dos mecanismos possíveis a sua atividade como substrato desta enzima. É também possível que ambas as formas de interferência ocorram simultaneamente. Independentemente dos mecanismos, níveis elevados de bilirrubina em amostras de pacientes podem produzir resultados errados, e devem ser avaliadas com atenção (Kroll e McCudden, 2013).

1.4. Referências bibliográficas

Aguirre LD, Hurst SF, Choi JS, Shin JH, Hinrikson HP, Morrison CJ. Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunist mold and yeast by PCR-enzyme. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3495-504.

Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Pelaez T, Peman J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3380-3387.

Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia.* 2007;163(4):191-202.

Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clinical Infectious Diseases.* 2002;34(1):7-14.

Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, et al. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):389-394.

Badiee P, Alborzi A. Detection of *Aspergillus* species in bone marrow transplant patients. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(8):511-516.

Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3138-3141.

Bardalaye PC, Nordin JH. Chemical structure of the galactomannan from the cell wall of *Aspergillus niger*. *J Biol Chem.* 1977;252(8):2584–2591.

Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):545-561.

Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica (Cairo).* 2013;459405.

Blanco JL, Guedeja-Marrón J, Caballero J, García ME. Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15(1):10-15.

Bouchara JP, Tronchin G, Larcher G, Chabasse D. The search for virulence determinants in *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 1995;3(8):327-330.

Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Ritter J, Suedhoff T, Baldus M, et al. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples

- from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clin Infect Dis*. 2001;33(4):428-435.
- Burgos A, Zaoutis TE, Dvorak CC, Hoffman JA, Knapp KM, Nania JJ, et al. Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics*. 2008;121(5):1286-1294.
- Burns ER, Yoshikawa N. Hemolysis in serum samples drawn by emergency department personnel versus laboratory phlebotomists. *Lab Med*. 2002;33(5):378-380.
- Caillot D, Mannone L, Cuisenier B, Couaillier JF. Role of early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7(2):54-61.
- Da Rin G. Pre-analytical workstations: a tool for reducing laboratory errors. *Clin Chim Acta*. 2009;404(1):68-74.
- Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(3):447-465.
- Dasgupta A, Sepulveda JL. Accurate results in the clinical laboratory, a guide to error detection and correction. 1 Ed. London:Elsevier; 2013. p. 53-61.
- Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. "Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review." *Clin Infect Dis*. 2003; 37(3):265-280.
- Desoubreux G, Bailly É, Chandener J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: updates and recommendations. *Med Mal Infect*. 2014;44(3):89-101.
- El Saleeby CM, Allison KJ, Knapp KM, Walsh TJ, Hayden RT. Discordant rise in galactomannan antigenemia in a patient with resolving aspergillosis, renal failure, and ongoing hemodialysis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3560-3563.
- Ferns RB. Evaluation of the role of real-time PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(1):15-20.
- Franquet T, Müller NL, Giménez A, Guembe P, de La Torre J, Bagué S. Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. *Radiographics*. 2001;21(4):825-837.
- Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):56-93.

- Fukuda T, Boeckh M, Carter RA. Risks and outcomes of invasive fungal infectious in recipients of allogenic hematopoietic stem cell transplantations after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 2003;102(3):827-833.
- Garcia ME, Caballero J, Cruzado M, Andrino M, Gonzalez JF, Blanco JL. The value of the determination of anti-*Aspergillus* IgG in the serodiagnosis of canine aspergillosis: comparison with galactomannan detection. *J Vet Med Series B*. 2001;48(10):743-750.
- Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Differences and Similarities Amongst Pathogenic *Aspergillus* Species. In: Pasqualotto AC. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Porto Alegre: Springer; 2010. p. 135-158.
- Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem*. 1989;35(5):837-839.
- Grant MS. The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples. *J Emerg Nurs*. 2003;29(2):116-121.
- Guder WG. History of the preanalytical phase: a personal view. *Biochem Med* 2014;24(1):25-30.
- Hachem R, Sumoza D, Hanna H, Girgawy E, Munsell M, Raad A. Clinical and radiologic predictors of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients: should the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) criteria be revised? *Cancer*. 2006;106(7):1581-1586.
- Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) β -d-Glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):129-133.
- Hamaki T, Kami M, Kanda Y, Miyakoshi S, Ueyama J, Morinaga S, et al. False-positive results of *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay in a patient with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28(6):633-634.
- Hadrich I, Mary C, Makni F, Elloumi M, Dumon H, Ayadi A, et al. Comparison of PCR-ELISA and Real-Time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with haematological malignancies. *Med Mycol*. 2011;49(5):489-494.
- Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Böhme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis*. 2000;181(5):1713-1719.
- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 2002;347(6):408-415.

Henry T, Iwen PC, Hinirickson SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1510-1515.

Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(10):609-622.

Houbraken J, Verweij PE, Rijs AJ, Borman AM, Samson RA. Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2754-2761.

Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1996;100(2):171-178.

Ismail A, Shingler W, Seneviratne J, Burrows G. In vitro and in vivo hemolysis and potassium measurement. *BMJ*. 2005;330(7497):949.

Jiang Z, Wang Y, Jiang Y, Xu Y, Meng B. Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to *Aspergillus nidulans* resulting in spinal cord compression: Case report and literature review. *J Int Med Res*. 2013;41(2):502-510.

Kim SY, Lee KS, Han J, Kim J, Kim TS, Choo SW, et al. Semiinvasive pulmonary aspergillosis: CT and pathologic findings in six patients. *AJR Am J Roentgenol*. 2000;174(3):795-798.

Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis*. 2010;50(8):1091-1100.

Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011;20(121):156-174.

Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem*. 1994;41(5):1996-2005.

Kroll MH, McCudden CR. Endogenous Interferences in Clinical Laboratory Tests: Icteric, Lipemic and Turbid Samples. Boston: de Gruyter; 2013. p. 63-73.

Kwak EJ, Husain S, Obman A, Meinke L, Stout J, Kusne S, et al. Efficacy of galactomannan antigen in the Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for diagnosis of invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):435-438.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):310-350.

- Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol. 2001;9(8):382-389.
- Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. Cochrane Database Syst Rev. 2008;8(4):CD007394.
- Lima-Oliveira GDS, PichethII G, Sumitalll NM, Scartezinil M. Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros. J Bras Patol Med Lab. 2009;45(6):441-447.
- Lippi G, Salvagno GL, Brocco G, Guidi GC. Preanalytical variability in laboratory testing: influence of the blood drawing technique. Clin Chem Lab Med. 2005;43(3):319-325.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of short-term venous stasis on clinical chemistry testing. Clin Chem Lab Med. 2005;43(8):869-875.
- Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le StratY, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIFnetwork (2005–2007). Clin Microbiol Infect. 2011;17(12):1882-1889.
- Maertens J, Vreboos M, Boogaerts M. Assessing risk factors for systemic fungal infectious. Eur J Cancer Care (Engl). 2001;10(1):56-62.
- Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. Clin Infect Dis. 2005;40(12):1762-1769.
- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. Clin Infect Dis. 2007;45(2):205-216.
- Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis. 2004;4(6):349-357.
- Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola AM, Ratto S, Bacigalupo A, et al. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1746-1748.
- Mitchel TG. Overview of basic medical mycology. Otolaryngol Clin Nort Am. 2000;33(2):237-249.
- Muñoz P, Guinea J, Bouza E. Update on invasive aspergillosis: Clinical and diagnostic aspects. Clinical Microbiology and Infection. 2006;12(24):24-39.

Murray PR, Rossenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia: Médica, 6 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009. pp. 740-743.

Oliveira, JC. Tópicos em Micologia Médica. 4 Ed. Rio de Janeiro: [s.n.]; 2014. p. 185-195.

Oren I, Avidor I, Sprecher H. Lack of intra-laboratory reproducibility in using Platelia Aspergillus enzyme immunoassay test for detection of Aspergillus galactomannan antigen. *Transplant Infect Dis.* 2012;14(1):107-109.

Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis.* 2010;50(8):1101-11.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007;45(4):321-346.

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. *Clin Infect Dis.* 2001;33(11):1824-1833.

Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(10):1417-1427.

Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(6):750-759.

Quindós G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(7):40-52.

Raja NS, Singh NN. Disseminated invasive aspergillosis in an apparently immunocompetent host, *Journal Microbiol Immunol Infect.* 2006;39(1):73-77.

Rementería A., López-Molina N, Ludwig A, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22(1):1-23.

Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):5-11.

Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection Diagnosis and Management*, 3 Ed. Victoria: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd; 2003. p. 166-200.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005;293(13):1653-1662.

Salman N, Törün SH, Budan B, Somer A. Invasive aspergillosis in hematopoietic stem cell and solid organ transplantation. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(3):307-315.

- Saraceno JL, Phelps DT, Ferro TJ, Futerfas R, Schwartz DB. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: approach to management. *Chest*. 1997;112(2): 541-548.
- Sidrim, JJC, Cordeiro RA, Rocha MFG. Aspergilose e fusariose. In: Sidrim, JJC, Rocha MFG. *Micologia médica a Luz de autores contemporâneos*. 1 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004; p. 275-282.
- Silva RF. Capítulo 8 - Infecções fúngicas em imunocomprometidos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2010;36(1):142-147.
- Simoneau E, Kelly M, Labbe AC, Roy J, Laverdière M. What is the clinical significance of positive blood cultures with *Aspergillus* sp in hematopoietic stem cell transplant recipients? A 23 year experience. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(3):303-306.
- Singh N. Invasive aspergillosis in organ transplant recipients: new issues in epidemiologic characteristics, diagnosis, and management. *Med Mycol*. 2005;43(1):267-270.
- Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* Infections in Transplant Recipients. *Clin. Microbiol*. 2005;18(1):44-69.
- Slavin M, Fastenau J, Sukarom I, Mavros P, Crowley S, Gerth WC. Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. *Int J Infect Dis*. 2004; 8(2):111-120.
- Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema GHJ, van der Lee HA, et al. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*. 2012; 7(3): e31801.
- Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prevost MC, Lesourd M, Kamphuis H, et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immun*. 1992; 60(6):2237-2245.
- Stojnic N, Vasiljevic ZV, Djuricic SM, Arsenijevic VA, Minic P. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis in an immunocompetent, obese 10-year-old boy. *Turk J Pediatr*. 2014; 56(6):654-657.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1411):983-989.
- Tanner M, Kent N, Smith B, Fletcher S, Lewer M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Ann Clin Biochem*. 2008;45(4):375-379.

Tanriover MD, Metan G, Altun B, Hascelik G, Uzun O. False positivity for *Aspergillus* antigenemia related to the administration of piperacillin/tazobactam. *Eur J Intern Med.* 2005;16(7):489-491.

Tell LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact in veterinary medicine. *Med Mycol.* 2005; 43(1):71-73.

Torelli R, Sanguinetti M, Moody A, Pagano L, Caira M, De Carolis E, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4273-4278.

Upton A, Gugel A, Leisenring W, Limaye A, Alexander B; Hayden R, et al. Reproducibility of low galactomannan enzyme immunoassay index values tested in multiple laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(9):4796-4800.

Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, Estes L, Caliendo AM, Baden LR, et al. Reduction in False-Positive *Aspergillus* Serum Galactomannan Enzyme Immunoassay Results Associated with Use of Piperacillin-Tazobactam in the United States. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):2199-2201.

Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1912-1924.

Vlahakis NE, Aksamit TR. Diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mayo Clin Proc.* 2001;76(9):930-938.

Von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlendorf M, Van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration.* 1995;62(6):341-347.

Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;46(3):327-360.

Wheat LJ. Galactomannan antigenemia detection for diagnosis of invasive aspergillosis, part I. *Clin Microbiol News.* 2005;27(8):51-57.

White PL, Barnes RA. Polymerase Chain Reaction. (PCR)-Based Tests. In: Pasqualotto AC. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention.* Porto Alegre: Springe; 2010. p. 135-158.

Xavier MO, Oliveira FM, Severo LC. Curso de atualização – micoses. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2009;35(9):907-919.

Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM.* 2007;100(6):317-334.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito das variáveis pré-analíticas sobre os resultados do teste comercial Platelia *Aspergillus*.

2.2 Objetivos específicos

- Em relação ao teste comercial Platelia *Aspergillus*:

- Avaliar a influência da temperatura de armazenamento das amostras (sem separação do plasma) na hemólise da amostra e consequentemente nos resultados do teste.

- Avaliar a influência do tempo de armazenamento da amostra (sem separação do plasma) na hemólise da amostra e consequentemente nos resultados do teste.

- Avaliar a influência da concentração da hemoglobina e da bilirrubina nos resultados do teste.

3. Artigo científico redigido em inglês

“Impact of pre-analytical variables in the determination of serum galactomannan”

Alexandre de Almeida Monteiro, Dominique Santos Rubenich, Marília Remuzzi Zandonáa, Alessandro Comarú Pasqualotto.

Enviado para publicação na Revista “Medical mycology”

**Impact of pre-analytical variables in the determination of serum
galactomannan**

Alexandre A. Monteiro^{1,2}, Dominique S. Rubenich¹, Marília R. Zandoná¹,
Alessandro C. Pasqualotto^{1,2*}

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil;

² Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Running Head: Impact of hemolysis in serum galactomannan.

*Address correspondence to Alessandro C. Pasqualotto, pasqualotto@ufcspa.edu.br Molecular Biology Laboratory, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Av Independência 155, 8º andar, 90035-075, Porto Alegre, Brazil. Tel: +55 51 99951614; Fax: +55 51 32137491;

Abstract

Invasive aspergillosis (IA) is associated with a high morbidity and mortality. Since *Aspergillus* species are infrequently recovered in culture, presumptive diagnosis of IA is usually based on galactomannan (GM) detection. Several factors are known to cause false-positive results in the GM test but little is known on the influence of pre-analytical variables interfering in GM detection. Here we studied the influence of temperature and duration of sample storage in GM results. We also evaluated the effect of hemolysis and hyperbilirubinemia on GM optical indices. We found no influence of storage time (up to 96h) and temperatures (refrigerated and room temperature) on GM results. However, bilirubin (Spearman correlation co-efficient 0.657; $p=0.020$) and hemoglobin (Spearman correlation co-efficient -0.886; $p<0.0001$) content influenced GM readings in samples known for being GM positive at baseline. We conclude that the Platelia GM test does not suffer major influence of pre-analytical variables such as storage conditions, hemolysis and hyperbilirubinemia. Hemolysis seems to interfere with GM readings in GM-positive samples. These findings may facilitate logistics and the implementation of standard operational procedures in clinical laboratories.

Key-words: Galactomannan; aspergillosis; hemolysis; jaundice.

Introduction

Invasive aspergillosis (IA) is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients¹. Most cases of IA are currently diagnosed based on the detection of galactomannan (GM)², a heat-stable and water-soluble polysaccharide that is present in the cell wall of a variety of fungi, particularly *Aspergillus* species. GM testing in patients with IA is mostly limited by the occurrence of false-positive results, which have been associated with several host-related factors, including antibiotic use, mucositis, dietary factors, and dialysis, as well as cross-reaction with other fungi^{3,4}. Limited information is available on the importance of pre-analytical variables as a potential cause of false-positive serum GM results. Pre-analytical variables are known to closely relate to the performance of laboratory tests. One of the most cited interfering agents is hemolysis, which affects about 3% of all laboratory samples in clinical laboratories⁵⁻⁷. This may be related to a clinical and pathological condition, errors in the collection procedure, processing, transportation or inappropriate sample storage⁸⁻¹⁰. In an attempt to study the potential impact of pre-analytical variables as a cause of false-positive GM result, here we investigated the effect of different storage conditions on GM readings.

Methods

Seven blood collection tubes (2 ml per tube; BD Vacutainer® SST® II Advance®, Becton Dickinson and Company, USA) were taken from adult healthy volunteers. Serum was separated and the following analyses were performed, as hemolysis markers: lactate dehydrogenase (LDH), hemoglobin (Hb) and total bilirubin. Samples were stored at two different temperatures: 2-8°C (refrigerated) and 20-25°C (room temperature). Temperatures were controlled by the use of a refrigerator and a microbiological incubator, respectively and checked continuously with calibrated thermometers. Laboratorial analyses (which also included GM optical density determination) were performed at predetermined times: at baseline (immediately after blood was taken) and after 48h, 72h and 96h of storage (Figure 1).

GM was tested using Platelia *Aspergillus* Ag kit (Bio-Rad, California, USA) following strictly the manufacturer's instructions. Plates were read in iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, California, USA). The optical density (OD) results were translated in GM-OD index (GM-ODI), relative to the mean optical density of the cut-off controls (GM-ODI was the result of the sample OD, divided by mean OD of the cut-off control serum). The positivity threshold for GM was ≥ 0.5 , as recommended by the manufacturer. Bilirubin concentrations were determined with a colorimetric test (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) and LDH was determined with kinetic test (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), both measured in the BS-120 Chemistry Analyzer (Mindray, Shenzhen, China). Serum hemoglobin was determined using a kit for manual measurement

(colorimetric test, Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), with later reading in UV-VIS Spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

In order to study the effect of pre-analytical factors in samples known to be positive for GM, half of the samples from healthy volunteers were spiked with 50 μ L of a pool of positive GM controls, as follows. In summary, 20 mL of positive controls from the GM kits (*Platelia Aspergillus* Ag - Bio-Rad, California, USA) were mixed up with 30 μ L of a pure culture of a reference *A. fumigatus* strain (Afu72, given by David Denning - University of Manchester) [previous experiments showed that positive GM controls alone were unable to generate consistently positive GM results, when added to the sera of healthy individuals]. This pool allowed contaminating negative samples with a constant amount of GM in an array that was similar to serum. The pool was left with a GM-ODI of >6.9. To prevent external contamination, all procedures were performed in a laminar flow hood.

To evaluate the effect of high concentrations of bilirubin and Hb on samples being both positive and negative for GM, two concentration curves of these analytes were built, using bilirubin standard (10 mg/dL) and Hb standard (11.6 g/dL) (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil). For the construction of bilirubin curves, 6 tubes were successively numbered and received 200 μ L of negative serum control (from the GM kit). Then, tubes were organized as followed: Tube 0: 400 μ L of sterile saline; Tube 1: 350 μ L of saline and 50 μ L of bilirubin standard; Tube 2: 300 μ L of saline and 100 μ L bilirubin; Tube 3: 200 μ L of saline and 200 μ L of bilirubin; Tube 4: 100 μ L of saline and 300 μ L of saline and bilirubin; Tube 5: 400 μ L of bilirubin. The same curve was performed using 200 μ L of positive serum control (from GM kit), resulting in 6 additional tubes, as

before. The final volume of each tube was 600 μL . Of these, 300 μL were used for analysis of GM and 300 μL were reserved for the determination of bilirubin concentrations. For the Hb curves, we used the same number of tubes and volumes as for bilirubin. However Hb standards were previously diluted at 1:2, due to their high initial concentration.

Descriptive statistics were used to summarize the data. For statistical analysis, samples from every individual were compared with baseline results (paired samples). The Kolmogorov–Smirnov and the Shapiro–Wilk tests were used to test for data normality. Wilcoxon Signed Rank Test was used to test the results in the samples compared with baseline sample from each patient. P values of <0.05 were defined as statistically significant based on a 2-tailed test. All calculations were carried out using SPSS version 15.0.

This study was approved by ethics committee of the participating institutions and the volunteers were only included after signing the informed consent form.

Results

A total of 294 serum samples from 42 healthy volunteers were studied. These individuals were mostly women (71.4%) and median age was 23.5 years-old (11.25, interquartile range). Among the 21 volunteers included as negative controls, the mean (\pm standard deviation, sd) of GM-ODI was 0.18 ± 0.07 . For the 21 volunteers who had samples spiked with *GM/A. fumigatus* culture, mean (\pm sd) GM-ODI was 2.99 ± 1.26 .

Regarding samples that were GM negative at baseline, there was no significant difference in GM-ODI in any of the three moments of analysis (48h, 72h, and 96h), in comparison to baseline, regardless of the incubation temperature (Table 1). However, storing samples at room temperature resulted in a significant alteration in Hb and bilirubin concentrations, after 72h and 96h. LDH values increased significantly over time, regardless of the storage temperature.

For baseline GM-positive samples there was no significant change in GM-ODI over the periods of study (Table 2). However there was a significant difference in Hb values after 72h and 96h, for samples stored at room temperature. As before, LDH values varied in function of incubation time, in spite of the storage temperature.

Hb studies revealed that hemolysis was more pronounced in samples stored at room temperature, for both samples that were baseline GM-negative and GM-positive. However, that was not been sufficient to cause a significant change in GM optical indices.

Figure 2 shows the influence of Hb and bilirubin in the GM-ODI for GM-positive serum samples at baseline. Hb curve showed a significantly positive

correlation with GM-ODI (Spearman correlation co-efficient 0.657; $p=0.020$), while bilirubin had a significantly negative correlation with GM-ODI (Spearman correlation co-efficient -0.886; $p<0.0001$). For GM-negative samples at baseline, no significant correlation was found in either curves, both for Hb (Spearman correlation co-efficient 0.504; $p=0.095$) and bilirubin (Spearman correlation co-efficient -0.339; $p=0.198$).

Discussion

This is the first study to document the effects of pre-analytical variables (hemolysis, temperature and storage time) in serum samples subjected to GM testing. Our data showed that Platelia GM test was highly robust, allowing for the analysis of samples stored for up to 5 days in room temperature. Furthermore, we showed that the presence of hemoglobin and bilirubin may interfere in serum GM-ODI for baseline GM-positive but not GM-negative samples.

Few studies have evaluated the short-term stability of samples tested for GM. When evaluating the repeatability of GM results after short-term storage¹¹⁻¹³, these studies found an ODI signal loss in 68-85% of samples. In our study, storage of serum samples at room temperature for up to 96h resulted in a decrease of 57% (for GM-negative samples) and 62% (GM-positive samples) in GM-ODI. Despite this reduction, no significant difference in GM results was found in any of the collection times and temperatures. By testing samples with optical indices very close to positivity (0.5), Johnson *et al.* found that 65.2% of positive GM samples turned negative, when the test was repeated on the same sample¹³. Loss of signal in the GM test is more common for samples that are close to the cut-off for test positivity (i.e., 0.5) in comparison to samples with high OD-values (≥ 1.0)¹⁴. Conversely, other studies have evaluated the stability of GM in frozen samples, stored for long periods. In these studies, GM positivity was reduced by 20-68% simply by the effect of long-term storage¹³⁻¹⁷. However, these data need to be evaluated carefully, as they may be related to low initial GM content. In contrast, other studies found that GM readings remained stable over time^{18,19}.

When analyzing the impact of baseline GM status on Hb and bilirubin curves, we noticed that GM-positive samples suffered more influence of the presence of large amounts of these analytes. Due to the influence of hemolysis in the accuracy and reliability of many laboratorial tests, this has been considered the most undesirable and common interference condition in clinical laboratory tests. Free hemoglobin, for example, has a high absorbance at wavelengths ranging between 415 and 570 nm. Thus, their release as a result of the occurrence of hemolysis can potentially increase in the concentration of the analytes measured in this wavelength range due to the increase in measured absorbance of these samples^{10,20}. Therefore, hemolysis and hyperbilirubinemia can directly influence GM results, particularly in GM-positive samples. Although the package insert for Platelia kit informs that values of bilirubin (20 mg/L of bilirubin) and Hb (500 mg/dL) do not influence the results, these experiments have never been published. Even though we observed an effect of Hb and bilirubin curves in samples kept at room temperature, this alteration was not sufficient to cause a change in GM-ODI, both in GM-positive and GM-negative samples.

Conclusions

This study provides some important information to facilitate clinical laboratories to organize the logistics of GM testing. In particular, we now know that GM readings are not affected by storage of samples for up to 5 days in room temperature. Moreover, the assay was not affected by the presence of hemoglobin or bilirubin in serum samples that were negative for GM. However, both hemolysis and jaundice may have an influence on GM readings in

individuals who are GM positive. High hemoglobin concentrations can increase GM-ODI by up to 28% and high bilirubin concentrations can reduce GM-ODI by up to 48.9%. These data may be clinically useful when interpreting GM results in patients at risk for IA.

Acknowledgements

We are in debt with Tatiane Caroline Daboit, Cintia Tusset, Elias da Rosa Hoffmann e Jaqueline da Silva Oliveira for their help in the conduction of this study. Dr Pasqualotto receives a grant from CNPq (Brazilian government). Galactomannan kits were kindly provided by Pfizer (Laurent Baes). Acquisition of other reagents was made possible due to a grant from CAPES (PNPD).

References

1. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 2007; 45 (2): 205-216.
2. Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2015; 162 (2): 81-89.
3. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia.* 2007; 163 (4): 191-202.
4. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating GM for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4 (6): 349-357.
5. Stynen D, Sarfati J, Goris A, et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect Immun.* 1992; 60 (6): 2237-2245.
6. Stevens DA, Kan VL, Judson MA, et al. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2000; 30 (4): 696-709.
7. Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, et al. Reduction in False-Positive *Aspergillus* Serum Galactomannan Enzyme Immunoassay Results Associated with Use of Piperacillin-Tazobactam in the United States. *J Clin Microbiol.* 2014; 52 (6): 2199-2201.
8. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of short-term venous stasis on clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43 (8): 869-875.

9. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *J Am Med Assoc.* 2005; 293 (13): 1653-1662.
10. Burns ER, Yoshikawa N. Hemolysis in serum samples drawn by emergency department personnel versus laboratory phlebotomists. *Lab Med.* 2002; 33 (5): 378-380.
11. Oren I, Avidor I, Sprecher H. Lack of intra-laboratory reproducibility in using Platelia Aspergillus enzyme immunoassay test for detection of Aspergillus galactomannan antigen. *Transpl Infect Dis.* 2012; 14 (1): 107-109.
12. Bizzini A, Marchetti O, Meylan P. Response to: lack of intralaboratory reproducibility in using Platelia Aspergillus enzyme immunoassay test for detection of Aspergillus galactomannan antigen. *Transpl Infect Dis.* 2012; 14 (3): 218-219.
13. Johnson GL, Sarker SJ, Hill K, et al. Significant decline in galactomannan signal during storage of clinical serum samples. *Int J Mol Sci.* 2013; 14 (7): 12970-12977.
14. Dufresne SF, Beauchemin S, Lavallée C, Laverdière M. Instability of Aspergillus galactomannan in stored clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2014; 52 (12): 4435-4436.
15. Kimpton G, Lewis White P, Barnes RA. The effect of sample storage on the performance and reproducibility of the galactomannan EIA test. *Med Mycol.* 2014; 52 (6): 618-626.

16. Pedroza KC, Matos SB, Moura DL, et al. Reproducibility of positive results for the detection of serum galactomannan by Platelia *Aspergillus* EIA. *Mycopathologia*. 2013; 176 (3-4): 295-297.
17. Pereira CN, Del Nero G, Lacaz CS, Machado CM. The contribution of galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Mycopathologia*. 2005; 159 (4): 487-493.
18. Wheat LJ, Nguyen MH, Alexander BD, et al. Long-term stability at -20°C of *Aspergillus* galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage specimens. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (6): 2108-2111.
19. Guigue N, Lardeux S, Alanio A, Hamane S, Tabouret M, Bretagne S. Importance of operational factors in the reproducibility of *Aspergillus* galactomannan enzyme immune assay. *PLoS One*. 2015; 10 (4): e0124044.
20. Ismail A, Shingler W, Seneviratne J, Burrows G. In vitro and in vivo hemolysis and potassium measurement. *Br Med J*. 2005; 330 (7497): 949.

Table 1 - Effect of incubation time at different temperatures on variables such as galactomannan, bilirubin, LDH and hemoglobin, in serum of healthy volunteers who had initially tested negative for GM. All comparisons are made in relation to baseline (time zero) results.

	Baseline	Temp	Difference from baseline					
			48h	p value	72h	p value	96h	p value
GM	0.18 ± 0.07 (mean ± sd; ODI)	Refrig	0.18 ± 0.06	0.467	0.18 ± 0.08	0.925	0.16 ± 0.04	0.107
		RT	0.20 ± 0.09	0.851	0.18 ± 0.08	0.958	0.15 ± 0.04	0.150
Bilirubin	0.49 ± 0.34 (mean ± sd; mg/dL)	Refrig	0.49 ± 0.34	0.955	0.48 ± 0.34	0.410	0.47 ± 0.33	0.350
		RT	0.50 ± 0.34	0.155	0.52 ± 0.33	0.006	0.51 ± 0.33	0.044
LDH	295.53 ± 93.35 (mean ± sd; mg/dL)	Refrig	447.72 ± 134.81	0.000	480.95 ± 168.01	0.000	497.38 ± 153.25	<0.0001
		RT	497.57 ± 202.03	0.000	574.10 ± 224.10	0.000	634.57 ± 283.70	<0.0001
Hemoglobin	0.40 ± 0.36 (mean ± sd; g/L)	Refrig	0.40 ± 0.25	0.505	0.43 ± 0.34	0.107	0.43 ± 0.41	0.176
		RT	0.45 ± 0.32	0.167	0.46 ± 0.32	0.043	0.48 ± 0.38	0.012

Legend: LDH, lactate dehydrogenase; ODI, optical density index; Refrig, refrigerated (2-8°C); RT, room temperature (20-25°C); sd, standard deviation; Temp, temperature.

Table 2 - Effect of incubation time at different temperatures on variables such as galactomannan, bilirubin, LDH and hemoglobin, in serum of healthy volunteers who initially tested positive for GM (spiked serum samples). All comparisons are made in relation to baseline results.

	Baseline	Temp	Difference from baseline					
			48h	p value	72h	p value	96h	p value
GM (mean ± sd; ODI)	2.99 ± 1.26	Refrig	2.68 ± 1.12	0.073	2.66 ± 1.13	0.065	2.66 ± 1.03	0.056
		RT	2.63 ± 1.13	0.063	2.69 ± 0.96	0.113	2.61 ± 1.12	0.089
Bilirubin (mean ± sd; mg/dL)	0.58 ± 0.43	Refrig	0.60 ± 0.44	0.666	0.57 ± 0.42	0.431	0.56 ± 0.44	0.121
		RT	0.59 ± 0.45	0.102	0.59 ± 0.44	0.312	0.60 ± 0.45	0.640
LDH (mean ± sd; mg/dL)	432.62 ± 129.08	Refrig	534.43 ± 168.33	0.030	547.67±156.89	0.006	642.76±184.54	<0.0001
		RT	636.29 ± 196.76	<0,0001	658.29±219.58	<0.0001	756.52±229.79	<0.0001
Hemoglobin (mean ± sd; g/L)	0.29 ± 0.16	Refrig	0.31 ± 0.17	0.299	0.32 ± 0.19	0.167	0.32 ± 0.18	0.020
		RT	0.35 ± 0.19	0.054	0.35 ± 0.19	0.020	0.40 ± 0.23	0.001

Legend: LDH, lactate dehydrogenase; ODI, optical density index; Refrig, refrigerated (2-8°C); RT, room temperature (20-25°C); sd, standard deviation; Temp, temperature.

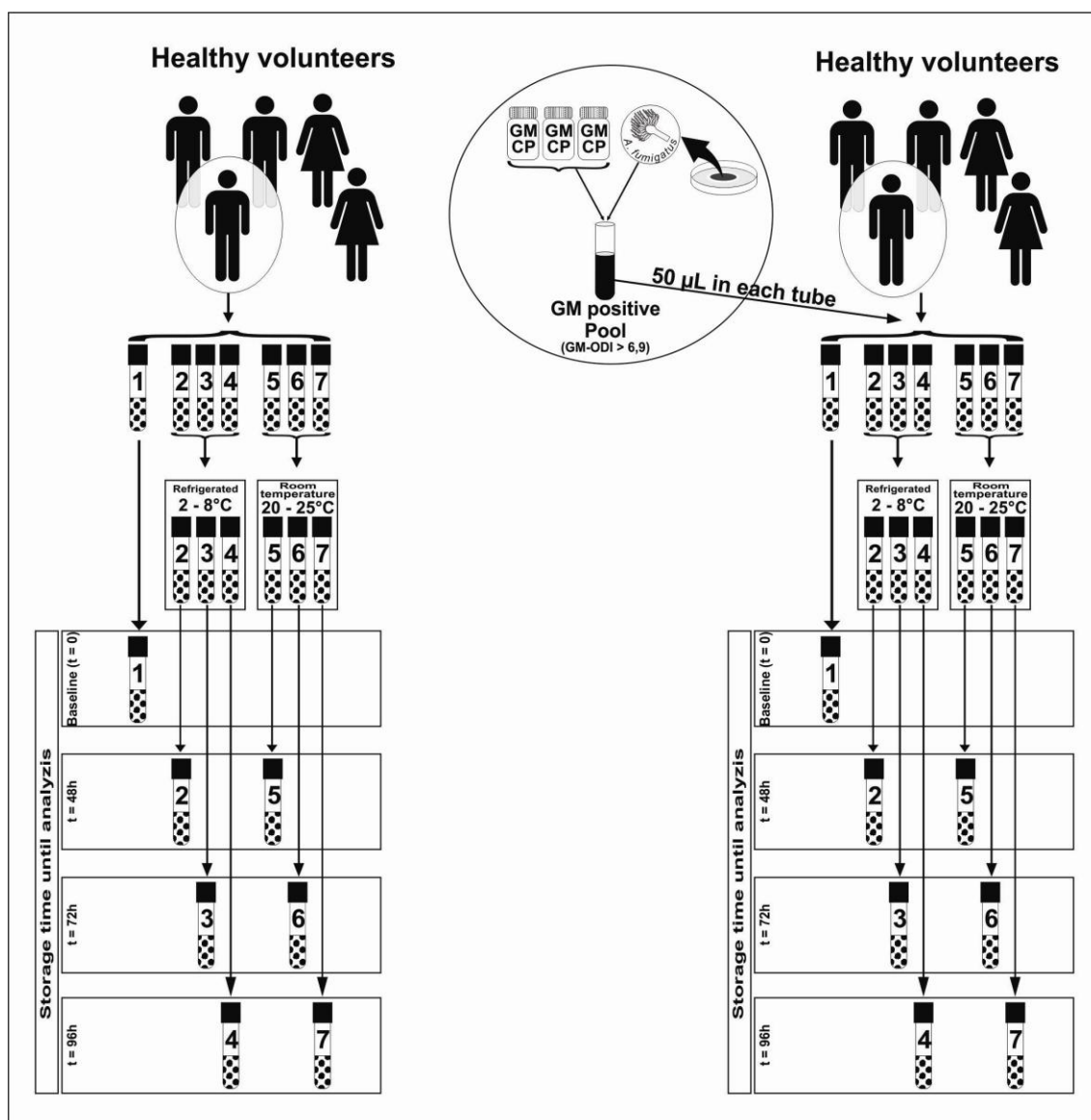


Figure 1 - Study design: Study design: seven blood collection tubes were taken from healthy adult volunteers. Samples were stored at two different temperatures, 2-8°C (refrigerated) and 20-25°C (room temperature). Laboratorial analyses were performed at baseline and after 48h, 72h and 96h of storage. Also, half of the samples from healthy volunteers were spiked with 50 µL of a pool of positive GM control (20 mL of positive controls from the GM kits mixed with 30 µL of culture of *A. fumigatus* strain (Afu72, given by David Denning - University of Manchester). In each analysis were performed GM optical density determination, lactate dehydrogenase, hemoglobin and total bilirubin.

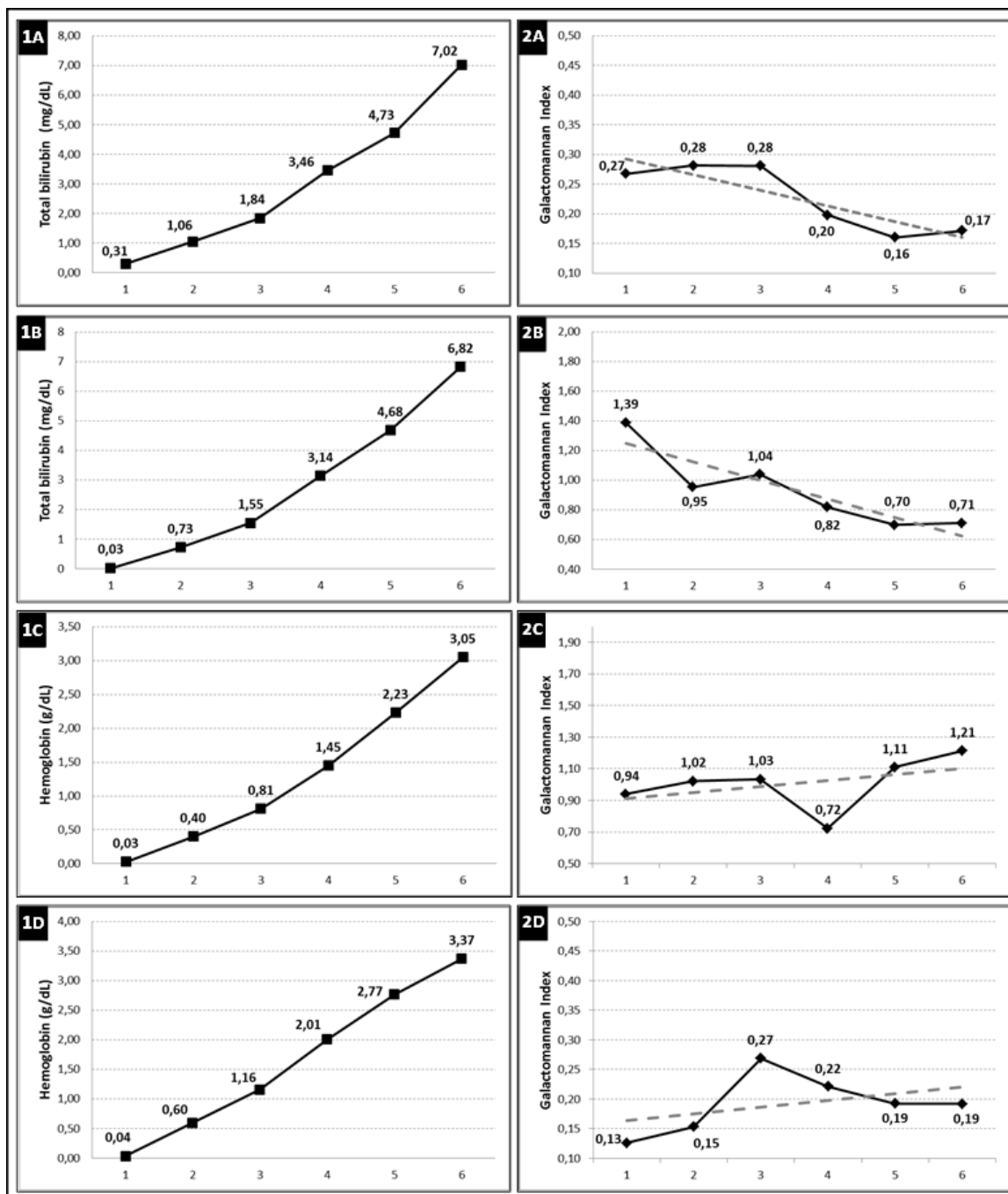


Figure 2 - Effect of concentration curves of hemoglobin and bilirubin on the GM-ODI results: 1A - bilirubin concentration curve (points 1 to 6 of the x-axis); 1B - negative GM-ODI measured in the respective 6 points of bilirubin curve (1A); 2A - bilirubin concentration curve (points 1 to 6); 2B - positive GM-ODI measured in in the respective 6 points of bilirubin curve (2A); 3A - hemoglobin concentration curve (points 1 to 6); 3B - negative GM-ODI measured in in the respective 6 points of hemoglobin curve (3A); 4A - hemoglobin concentration

curve (points 1 to 6); 4B - negative GM-ODI measured in in the respective 6 points of hemoglobin curve (4A).

4. Considerações finais

Este estudo fornece algumas informações importantes, que podem auxiliar os laboratórios clínicos na organização da logística para os testes GM. Entre as análises realizadas, observamos que os parâmetros bioquímicos utilizados para avaliar a hemólise sofreram variações de acordo com o armazenamento. Entre eles, o LDH apresentou a maior variação (em todos os tempos e temperaturas). Ao analisarmos os três analitos em conjunto (LDH, BT e HB), verificamos que há um aumento da hemólise com o armazenamento. No entanto, este aumento não é suficiente para provocar alterações nos valores de GM. Assim, sabemos agora que as leituras GM não são afetadas pelo armazenamento das amostras por até 5 dias, mesmo em TA, bem como pela variação sofrida nos valores Hb ou BT quando as amostras de soro são armazenadas por estes períodos.

Por fim, ao analisarmos os resultados de GM nas curvas de Hb e BT, percebemos que as amostras positivas para GM podem sofrer alteração na presença de grandes quantidades destes dois analitos. O excesso de Hb pode aumentar GM-ODI em até 28% e o excesso de BT pode reduzir a ODI-GM em até 48,9%. Desta forma, nossos dados são clinicamente úteis na interpretação dos resultados de GM em pacientes com risco de AI.

Desta forma, concluímos que, se estivermos atentos a algumas variáveis pré-analíticas, como hemólise e hiperbilirrubinemia, o teste de GM é altamente robusto e pode ser analisado em amostras com até 5 dias de armazenamento, proporcionando resultados seguros e não invasivos.

5. Anexos**Anexo I: Parecer consubstanciado CEP ISCMPA/UFCSPA**

Anexo I: Parecer consubstanciado CEP ISCMPA/UFCSPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito da hemólise no teste de quantificação da galactomanana

Pesquisador: ALESSANDRO COMARÚ PASQUALOTTO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 19168514.8.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 761.753

Data da Relatoria: 21/08/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de iniciação científica a ser realizado no laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa. Será avaliada a influência da hemólise sobre o ensaio de um kit de diagnóstico de aspergilose. Para realização dos ensaios, 20 mL de sangue de 22 indivíduos sadios serão coletados.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito da hemólise sobre os resultados do teste comercial Platelia Aspergillus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos. O benefício é o desenvolvimento da pesquisa que poderá auxiliar no diagnóstico da aspergilose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O autor enviou carta informando que já havia enviado a Folha de Rosto, porém o arquivo estava com nome diferente e estava corrompido, não podendo ser aberto.

Nesta oportunidade, o autor informa também que o documento foi anexado, no entanto, ainda está corrompido, não podendo ser aberto. Solicita-se que na próxima submissão, todos evite-se documentos em extensão .jpeg pois às vezes estes arquivos falham ao serem baixados.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 761.753

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita-se que na próxima submissão, todos evite-se documentos em extensão .jpeg pois às vezes estes arquivos falham ao serem baixados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende às exigências da RES 466/12 em seus aspectos éticos.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Término do projeto 02/2015.

De acordo com o parecer do Relator.

PORTO ALEGRE, 22 de Agosto de 2014

Assinado por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Anexo II: Normas da revista "Medical Mycology"

Anexo II: Normas da revista “Medical Mycology”

MANUSCRIPT PREPARATION

SUBMISSION

All submissions must be uploaded as Word files to the Medical Mycology ScholarOne Manuscripts site at mc.manuscriptcentral.com/tmmy. Users who have not previously submitted work through this site must create an account from the link on the login page. Assistance with this and all other areas of the site is available in the User Guide, which is accessed via the 'Get Help Now' button at the top right corner of all ScholarOne Manuscript web pages. If you need additional help, please contact mmy@oup.com.

Permissions

Written permission should be obtained to adapt a part of or reprint an entire table, graph, or illustration that has been previously published. Authors are responsible for obtaining permission from the copyright holder to use copyrighted material prior to submission, and are responsible for paying any associated fees. Click [here](#) for more information on permissions.

HOW TO CONTACT THE EDITORIAL OFFICE

The Editorial Office can be contacted as follows:

Email: mm.editorialoffice@oup.com

ARTICLE TYPES

Papers may be submitted in the following categories.

Original Papers

Manuscripts must have: (a) a Cover-Page that includes the full title and a short title, name(s) and affiliation(s) of all author(s), the name, telephone/ fax numbers and email address of the designated corresponding author, and a list of up to five keywords; (b) a separate page for an Abstract of up to 250 words **prepared without sub-headers**; (c) text consisting of Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References; (d) **References must be cited sequentially in the order in which they first appear in the text, in superscript numerals, and included in the same numerical order in the Reference section**; (e) each Table should be submitted as a separate page and should have footnoted descriptions of all abbreviations contained in the Table (**see section below on Tables for more detailed information**); (f) each Figure should be submitted as a separate file (page), with appropriate figure legends allowing a reader to understand their contents without reference to the text (**see section below on Figures for more detailed information**). Manuscripts MUST be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, **without line numbering and up to approximately 30 manuscript pages (10-12 print pages) including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures.**

Reviews

Authors must first electronically submit an outline of their proposed article for evaluation by the journal. The outline should be no more than two, double-spaced pages in 12 point, in which the authors describe the objectives and contents of the report. The outline must be submitted to the Reviews Editor, Riina Richardson: Riina.Richardson@manchester.ac.uk. Once the proposal has been evaluated, the authors will be informed of the results of the Review Editor's initial consideration of their proposal. **Reviews are NOT restricted by the formatting or length requirements of Original Papers.**

Case Reports

Medical Mycology no longer publishes Case Reports. Such articles should be submitted to Medical Mycology Case Reports via www.ees.elsevier.com/mmcr from which all information pertaining to this on-line, open access ISHAM journal may be obtained.

Brief Reports

These concisely written manuscripts are to provide an opportunity for the presentation of innovative well-defined studies that do not warrant a full length original paper. These manuscripts are not for the publication of preliminary data.

The manuscript style is as follows: Cover page with title, authors, affiliations, corresponding author and 5 key words. An abstract of no more than 100 words. The text should be no more

than 1200 words with no headers or subheadings included, but must contain a brief introduction, methods, results and conclusions. Limit references to those that are absolutely necessary and no more than 20. No more than 2 tables or figures are allowed (e.g., 2 figures, 2 tables or 1 figure and 1 table).

Letters to the Editor

Letters are to allow readers the opportunity to discuss issues related to previously published original articles, short communications, and reviews in *Medical Mycology*. Letters are **NOT** to be used for the presentation of the authors' preliminary data from their own investigations. **Letters should be no longer than 750 words, excluding references (approximately 2 print pages), and be in no less than size 12 point font.**

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Please refer to a recent issue of *Medical Mycology* for guidance on style and layout of articles. Also refer to the Article Types section for guidance on relevant information for each article type.

File Formats

All manuscripts must be submitted as Microsoft Word documents (.doc, .docx, .rtf, .pdf files).

Manuscript Preparation

Manuscripts MUST be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, organized as appropriate for the manuscript type and have one inch margins all around. Statistics and measurements should be given in numerals when followed by a unit, e.g., mg, ml, etc. In contrast, numerals employed in other circumstance, e.g., two patients, should be spelled out if less than ten (10). ALL abbreviations, even those commonly used in medical mycology, e.g., Sabouraud glucose agar (SGA), must be defined when first used in the abstract and text. Please NOTE that the inability of authors to clearly present the contents of their submissions in English may constitute grounds for the immediate rejection of the papers or their return to authors so that they can correct their English usage prior to assignment to an associate editor. For authors who require professional assistance with English usage, there are companies that will provide assistance for a fee. For more information, see our language services page [here](#).

References

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. In preparing your citations please follow the AMA Manual of Style, 10th Edition. For detailed information, please [check here](#) under References.

Some key style points that *Medical Mycology* articles must follow:

- Number references in the order they appear in the text; do not alphabetize.
- In text, tables, and legends, identify references with superscript numerals.
- When listing references, follow AMA style and abbreviate names of journals according to the journals listed in PubMed. The abbreviation should be in italic font and a period inserted after the final abbreviation, e.g., *J Clin Microbiol.* ↓see period
- List all authors up to 6, but if more than 6, list the first 3 by name and the rest by "et al." *
- Journal references should include the issue number in parentheses after the volume number and before page numbers that should be inclusive (685-692, NOT 685-2).

Examples of reference style:

Journal article

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six authors] Title of paper. *J Title Abbrev.* 1995; 00 (1): 000-000.

- If the title is in a language other than English, the authors should provide the English translation. The name of the original language should be included within a bracket, e.g., [in Spanish], after pagination at the end of the citation. For example, Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six authors] Title of paper. *J Title Abbrev* 1995; 00 (1): 000-000 [in Spanish].

Book chapter

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six] Chapter title. In: Editor AB, Editor CD, eds. Book

Title With Initial Uppercase Letters (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995: 000–000.

Book

Author AB, Author CD (eds). Book Title With Initial Uppercase Letters (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995.

Thesis

Author AB. Paper title with lowercase initials to all words, except the first word. PhD thesis, University of X, 1995.

Conference proceedings/Supplements

Author AB. Paper title. In: Editor AB, ed. Proceedings Title, place, date. Place: publisher, 1995: 000–000.

Meeting abstracts

Abstracts of works presented at scientific meetings should be cited in brackets within the text of the manuscripts rather than in the Reference sections. The citations should be formatted as: Author AB. Abstract title. Name of meeting, its location, the date and abstract number.

Personal communications, Unpublished results etc.

References to personal communications, unpublished results and papers submitted for publication (but not yet accepted) should only appear in brackets in the text, and in the following form: [A. B. Author, unpublished results] or [C. D. Author, personal communication].

Tables

Tables should present only essential data, must be numbered sequentially in the order in which they are first referenced in the text, and all **MUST** be referred to in the text. Each table should be supplied as a separate page at the end of the main document and not imbedded within the body of the text. The table header should be **brief and self-explanatory**. If it contains generic and species names, these must be spelled out in full, e.g., *Candida albicans*, not *C. albicans*. Column headings should be brief and include units in parentheses where applicable. Only horizontal rule lines should be used and then only for headers and footers. Tables should be considered as “stand alone” documents through which data are summarized for presentation to readers. As such, all abbreviations employed in the tables **MUST** be defined by footnotes included directly below the tables.

Figures/Images

Images should be submitted as TIF, EPS, PDF, or JPG (preferred) files. Scanned images should be of a sufficient resolution, i.e., 300 dpi for halftones/color, 500 dpi for combination halftones and 1000–1200 dpi for line art. Illustrations should be submitted as individual files, separate from the manuscript text file. For more information about preparing figures, see our Figures page [here](#).

Authors will be charged USD 600 for each figure reproduced in color in the print version of the journal (for more information about charges, see the Medical Mycology Charges page [here](#)). However, any figure submitted as a color original may appear in color in the journal's online edition, without any charges being assessed to the authors. **NO** part of any image may be enhanced, removed, relocated, introduced or manipulated in any manner after the capture of the original image unless the authors provide the editor with a clear and accurate description of the nature of the image manipulation.

Figures, like tables, should be considered as “stand alone” components of the manuscript. As such, authors should provide legends at the end of the text, following the Reference section, which clearly describe the significant features of the illustrated objects. In addition, authors may employ, as warranted, arrows or similar indications.

Supplementary Files

Supplementary information, including extensive data sets, large figures, audio and DVD/video material, can be made available as part of the online version of your manuscript. Please do not include supplementary information within the main manuscript file, but upload the material as separate file(s), labeled as “Supplemental Digital Content”. Please include a sequential number (S1, S2, etc.) for each file and a brief description of the content at the appropriate position in the text. Please note that supplementary files are not copy-edited and will be presented as submitted.

Nomenclature

Proposals of new fungal taxa MUST conform to the requirements outlined in the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants. Some of the provisions are effective as of January 1, 2012, while others will subsequently become effective. The proposed taxon must be supported by deposition of cultures and/or the unique nucleotide and/or amino acid sequences in appropriate collections or databases, along with the new binomial. The identifier assigned to the taxon by these recognized repositories, e.g., Mycobank, must be included in the text, tables and figures. In addition, binomials should appear in italics, must be spelled out in full when first used in the abstract, text, figures/tables. Thereafter, a generic name may be abbreviated to the first initial only, e.g., *Candida albicans* when first cited and *C. albicans* in the remainder of the abstract and text, except at the beginning of a sentence where the genus should be spelled out in entirety. Species names may NEVER be used without the generic full name or abbreviation combined with the full name of the species. For example, it must be *Candida albicans* or *C. albicans*, but never *albicans*, or *C. neoformans var. grubii* but never *var. grubii*. The use of abbreviations of generic and species names, e.g., (Ca) for *C. albicans*, in the text is NOT permitted.

Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Data

DNA, RNA, and/or amino acid sequence data must be deposited in a freely accessible database. The GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>); ENA, [European Nucleotide Archive](http://www.ebi.ac.uk/ena/DDBJ)); (<http://www.ebi.ac.uk/ena/DDBJ>) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) accession numbers should be included in the Materials and Methods Section of the manuscript. However, in a figure of a phylogenetic tree, the numbers should be shown along with species names (e.g., *Malassezia globosa* AB099880) (No descriptions are needed in the Materials and Methods Section in this case).

High-Throughput Functional Genomics Data, Microarray, Next-Generation Sequencing Data

Papers that contain high throughput functional genomics, whole genome and microarray data must be deposited in the appropriate public database (URLs of databases at the end of this paragraph). Microarray data should comply with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) standards, except in cases where a microarray is used to identify one, or more, genes, for primary genetic screening. Submission of microarray data to a central repository (e.g., GEO, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; ArrayExpress, <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress> or CIBEX, <http://cibex.nig.ac.jp>) must be completed before submission of a manuscript and accession numbers for the data must be included in the original submission of manuscripts in order to be available for the reviewing process.

Phylogenetic Data

Phylogenetic data (e.g., trees of species, trees of populations, trees of genes) representing the fungal taxa that are presented in a relevant manuscript should be freely accessible to researchers through a public phylogenetic information repository (e.g., TreeBASE, <http://treebase.org>).

Data on New Macromolecule Structures

It is mandatory to deposit new macromolecule structures in the Protein Data Bank (<http://rcsb-deposit.rutgers.edu/> or <http://pdbdep.protein.osaka-u.ac.jp/en>) and the identification codes (accession numbers) must be included in the manuscript at the latest before the on line publication. However, inclusion of the coordinates in the original submission of the manuscript is encouraged in order to facilitate and expedite the reviewing process.

Strain Sharing

Authors of new taxa have to deposit the type strain, but preferably also other isolates in a publicly accessible culture collection. Authors of papers on known taxa describing novel properties (e.g., pathogenicity to humans and animals, genetic resistance to antifungal agents, identification of new bioactive metabolites) must deposit the strain(s) in publicly accessible culture collections and provide accession number(s) in the manuscript. Authors of first reported fungal strains in a certain geographical location or a new habitat must also submit these strains in publically accessible culture collections and accession number(s) should be provided in the manuscript. These strains should be available in good faith to the scientific community, through registered culture collections and their supply must conform to current national and international laws and regulations.

To ensure strain authenticity authors should indicate laboratory strain designations and donor sources as well as original culture collection identification numbers.

Medical Mycology encourages the exchange of organisms and genetic constructs among researchers. Thus, strains and also genetic constructs, such as plasmids that are not deposited in a publicly accessible culture collection should be made available by the authors on request for scientific purposes.

Acknowledgments

The work of other individuals who assisted in the studies or in the preparation of the submission must be specifically indicated in the Acknowledgments section of the paper. All sources of grant funding must be given and grant numbers given. See Manuscript Preparation for additional details.

FUNDING

Details of all funding sources for the work in question also should be given in the Acknowledgments section. The following rules should be followed:

- The sentence should begin: "This work was supported by ..."
- The full official funding agency name should be given, i.e. "the National Cancer Institute at the National Institutes of Health" or simply "National Institutes of Health" not "NCI" (one of the 27 sub-institutions) or "NCI at NIH." Please see [here](#) for a full RIN-approved list of UK funding agencies.
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: "[grant number ABX CDXXXXXX]"
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: "[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]"
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus "and" before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number "to [author initials]."

An example is given here: "This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789]."

Disclosures of Potential Conflicts of Interest

This section should appear after the Acknowledgments and should include any conflicts of interest.

Although there is no standard definition of Conflict of Interest, the United States National Institutes of Health has published the following statement:

It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership) that may be perceived as potentially affecting the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure (i.e., when in doubt, provide full disclosure).

In addition, a conflict of interest may be perceived to exist in such situations as when authors are affiliated with or employed by a private enterprise whose product or competitor's product, e.g., drug, device or diagnostic kit, is the focal point of the paper. See Manuscript Preparation for additional details.

Information about potential conflict of interest must be clearly stated at the point of submission. This may be made available to reviewers and may be published with the manuscript at the discretion of the Editors and Publisher. The journal recommends that you and your co-authors include the sub header, 'Conflict of Interest', in the Acknowledgment section at the end of your manuscript. If no such conflict exists, simply respond 'None'. If you or your co-authors have received funding that meets the criteria described in the paragraph above, the source(s) of the funds must be declared (NOTE – you are NOT required to disclose the amounts of funding that you or your co-authors have received). Furthermore, authors must indicate their employment if describing their or other companies' products.

The intent of this policy is not to prevent authors with these relationships from publishing work, but rather to adopt transparency such that readers can make objective judgments on conclusions drawn.

Further guidance on conflicts of interest is available [here](#).

JOURNAL COPYEDITING STYLE

Authors are referred to [this document](#) and the *AMA Manual of Style*, 10th Edition.

PERMISSION TO REPRODUCE THIRD-PARTY MATERIAL

All copyright permission must be cleared and, if necessary, paid for by the author; this includes applications and payments to DACS (Data Access Control System), ARS (Artists Rights Society), and similar licensing agencies where appropriate. It is also the author's responsibility to include acknowledgements as stipulated by particular institutions.

For more information, see the Rights and Permissions page [here](#).

CHARGES

Medical Mycology papers do not incur any page charges.

Color and Open Access charges are detailed here:

http://www.oxfordjournals.org/our_journals/mmy/for_authors/charges.html.

Anexo III – Banner do Congresso Brasileiro de Infectologia 2015

Anexo III – Banner do Congresso Brasileiro de Infectologia 2015

Impacto de variáveis pré-analíticas na determinação de galactomanana sérica

Alexandre A. Monteiro^{1,2}, Elias da R. Hoffmann¹, Marília R. Zandoná¹, Jaqueline da S. Oliveira^{2,3}, Cintia Tuset¹, Tatiane C. Daboit^{1,4}, Alessandro C. Pasqualotto^{1,2}
Contato: monteiro.aa@gmail.com

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre¹; Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre²; Hospital Nossa Senhora da Conceição³; Universidade Federal De Pelotas⁴; Universidade Feevale⁵

INTRODUÇÃO

- ✓ Galactomanana (GM) é um polissacarídeo termoestável e hidrossolúvel, componente da parede celular de fungos do gênero *Aspergillus*.
- ✓ Liberado durante o crescimento das hifas, este tem sido utilizado como um biomarcador para detectar a presença de *Aspergillus* em amostras clínicas.
- ✓ Recentemente foi desenvolvido um ensaio de ELISA para detecção da GM.
- ✓ Em associação com tomografia computadorizada, a dosagem de GM sérica tem sido o pilar central para o diagnóstico presuntivo de aspergilose invasiva, servindo como guia para a terapia antifúngica preemptiva.
- ✓ No entanto, pouco se sabe sobre as variáveis pré-analíticas que possam interferir em seus resultados.

OBJETIVOS

- ✓ Avaliar o impacto da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras clínicas nos resultados do teste comercial Platelia *Aspergillus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

- ✓ Foram obtidas amostras de soro (14 ml) de 20 voluntários adultos saudáveis. Sete tubos de coleta foram obtidos para cada indivíduo, para a realização das seguintes análises, visando documentar a presença de hemólise: GM, bilirrubina total (BT), lactato desidrogenase e hemoglobina (Hb).
- ✓ As análises foram realizadas em diferentes momentos: imediatamente e após 48h, 72h e 96h de armazenamento, utilizando-se duas faixas de temperaturas (2-8 C e 20-25 C).
- ✓ A fim de determinar se as mesmas alterações ocorreriam em amostras sabidamente positivas, contaminou-se amostras de soro com 10 µl de culturas de cepas-padrão puras de *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*.
- ✓ Para avaliar o efeito de altas concentrações de BT e Hb em amostras negativas e positivas para GM, realizou-se duas curvas de concentração, utilizando padrões comerciais destes analitos.

RESULTADOS

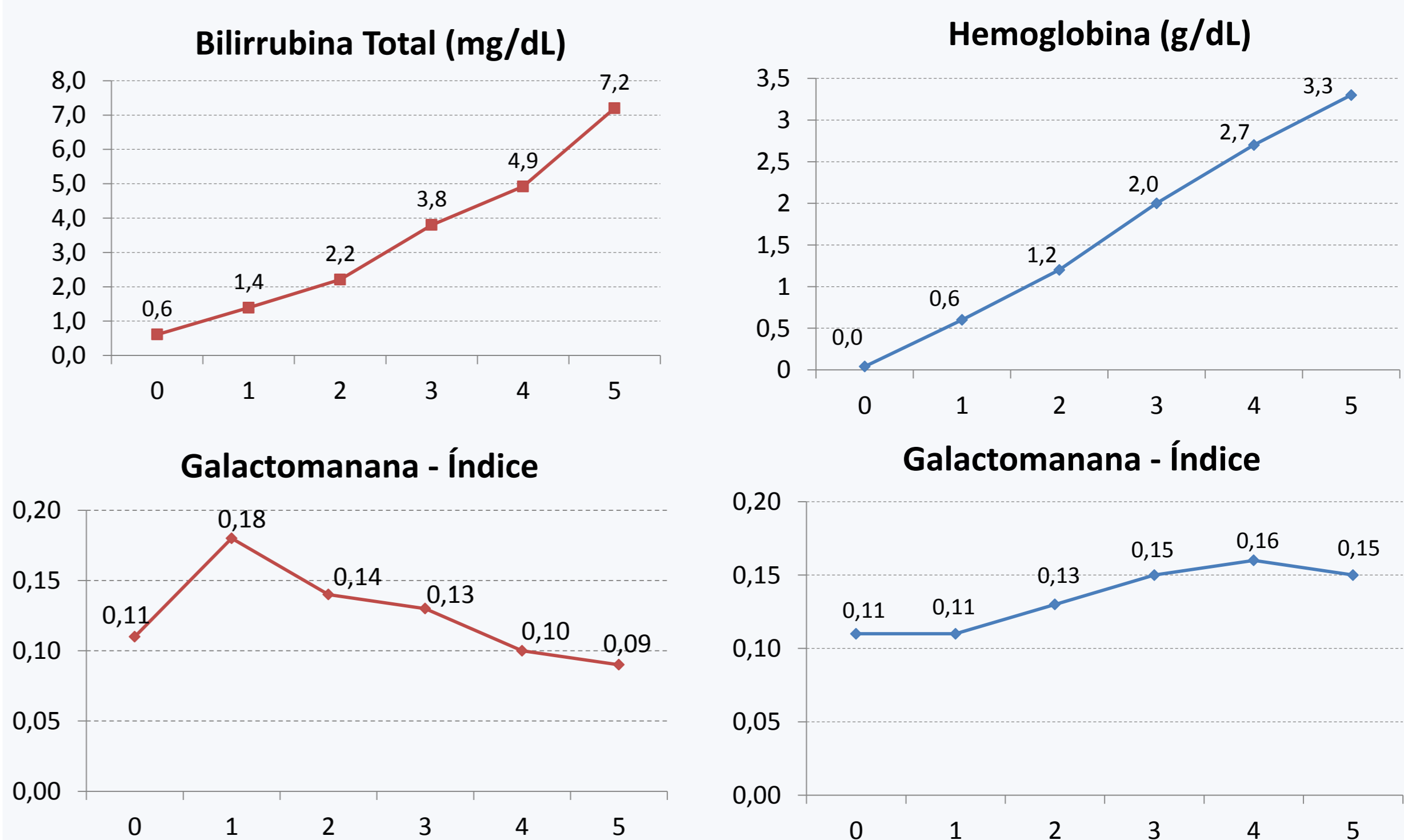
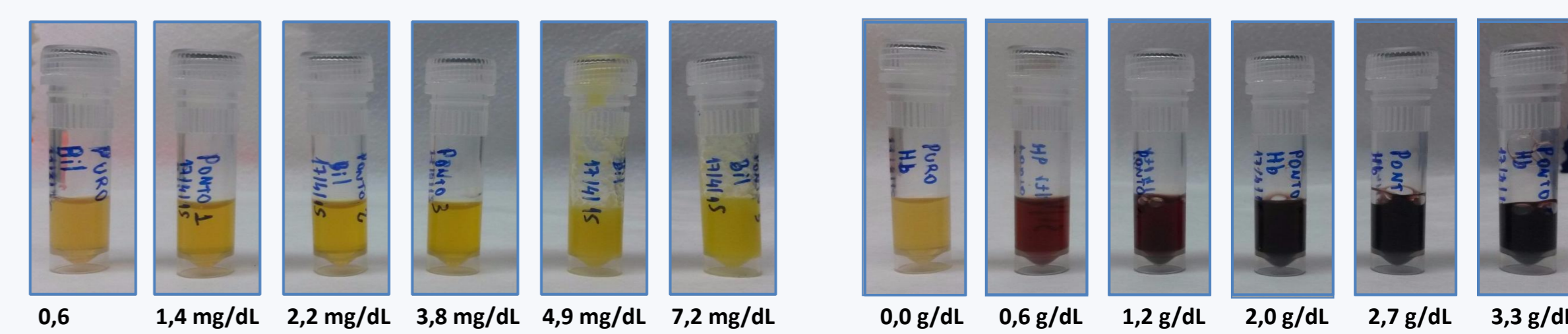
- ✓ Dentre as amostras negativas, não houve diferença significativa nas médias dos valores de GM em qualquer um dos tempos e temperaturas.
- ✓ Entre as amostras positivas, também não houve diferença significativa nas nas médias dos valores de GM.

Amostras negativas (n = 15)		Amostras positivas (n = 5)	
Tempo / Temperatura	Galactomanana (Índice)	Tempo / Temperatura	Galactomanana (Índice)
0h / 20-25°C	0,17	0h / 20-25°C	10,57
48h / 20-25°C	0,19	48h / 20-25°C	10,60
72h / 20-25°C	0,19	72h / 20-25°C	10,60
96h / 20-25°C	0,15	96h / 20-25°C	10,60
48h / 2-8°C	0,18	48h / 2-8°C	10,62
72h / 2-8°C	0,18	72h / 2-8°C	10,62
96h / 2-8°C	0,15	96h / 2-8°C	10,58

- ✓ Durante os tempos e temperaturas analisados, apenas os resultados de LDH se alteraram com o armazenamento.

BT (Médias) - Amostras negativas (n=15)											
0h	25°	4°	48h	25°	4°	72h	25°	4°	96h	25°	4°
0,53		0,52	0,55	0,50	0,55	0,50	0,55	0,50	0,53		
BT (Médias) - Amostras positivas (n=5)											
0h	25°	4°	48h	25°	4°	72h	25°	4°	96h	25°	4°
0,53		0,52	0,55	0,50	0,55	0,50	0,55	0,50	0,53		
LDH (Médias) - Amostras negativas (n=15)											
0h	25°	4°	48h	25°	4°	72h	25°	4°	96h	25°	4°
291		395	413	432	471	422	523				
LDH (Médias) - Amostras positivas											
0h	25°	4°	48h	25°	4°	72h	25°	4°	96h	25°	4°
291		395	413	432	471	422	523				
HEMOGLOBINA (Médias) - Amostras negativas											
0h	25°	4°	48h	25°	4°	72h	25°	4°	96h	25°	4°
0,15		0,16	0,19	0,17	0,19	0,13	0,15				
HEMOGLOBINA (Médias) - Amostras positivas											
0h	25°	4°	48h	25°	4°	72h	25°	4°	96h	25°	4°
0,01		0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01				

- ✓ Por fim, nas duas curvas realizadas (BT e Hb), mesmo nas maiores concentrações obtidas (7,2 mg/dL de BT e 3,3 g/dL de Hb), não houve diferença significativa nos resultados de GM.



CONCLUSÃO

- ✓ Os resultados deste estudo piloto permitem inferir que o teste da GM não é afetado pelo armazenamento da amostra por até 96h em temperatura ambiente, informação esta que pode auxiliar nos aspectos logísticos relacionados ao teste.
- ✓ Ainda, o ensaio mostrou que a teste não foi afetado pela presença de hemólise ou icterícia.

Apoio: Pfizer

