



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**LUIS FELIPE BACHUR**

Avaliação dos níveis séricos de 1-3-  $\beta$ -D-Glucana e da resposta Inflamatória em pacientes sépticos comparativamente a pacientes com Candidíase Invasiva

CAMPINAS

2019

## **LUIS FELIPE BACHUR**

Avaliação dos níveis séricos de 1-3-  $\beta$ -D-Glucana e da resposta Inflamatória em pacientes sépticos comparativamente a pacientes com Candidíase Invasiva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para Obtenção de título de Doutor em Ciências na área de Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA LUIZA MORETTI  
COORIENTADOR: PROF. DR. REINALDO SALMOMÃO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO LUIS FELIPE BACHUR  
E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. MARIA LUIZA MORETTI

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Bachur, Luis Felipe, 1981-  
B125a Avaliação dos níveis séricos de 1-3-B-D-Glucana e da resposta inflamatória em pacientes sépticos comparativamente a pacientes com candidíase invasiva / Luís Felipe Bachur. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Luiza Moretti.  
Coorientador: Reinaldo Salomão.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Candidíase invasiva. 2. Candidemia. 3. Sepse. 4. Glucana Endo-1,3-beta-D-Glucosidase. 5. Citocinas. 6. Interleucina-10. I. Moretti, Maria Luiza, 1953-. II. Salomão, Reinaldo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of serum levels of 1-3-B-D-Glucan and the inflammatory response in septic patients compared to patients with invasive candidiasis

**Palavras-chave em inglês:**

Invasive candidiasis  
Candidemia  
Sepsis  
Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase  
Cytokines  
Interleukin-10

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Maria Luiza Moretti [Orientador]  
Ho Yeh Li  
Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros  
Francisco Hideo Aoki  
Maria Heloísa Souza Lima Blotta

**Data de defesa:** 28-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6505-3418>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7309211773538455>

# **COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**NOME DO ALUNO – LUÍS FELIPE BACHUR**

---

**ORIENTADOR: Profa.Dra. Maria Luiza Moretti**

**COORIENTADOR: Prof.Dr Reinaldo Salomão**

---

## **MEMBROS:**

**1. PROFA. DRA. MARIA LUIZA MORETTI**

**2. PROFA. DRA. HO YEH LI**

**3. PROF. DR. EDUARDO ALEXANDRINO SERVOLO DE MEDEIROS**

**4. PROF.DR. FRANCISCO HIDEO AOKI**

**5. PROFA. DRA. MARIA HELOÍSA SOUZA LIMA BLOTTA**

---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 28/02/2019**

***Dedicatória***

***A Deus***

***A minha família:***

***Meus pais Felipe e Maria do Rosário,***

***Meus irmãos João Paulo e Maria Carolina,***

***Meus cunhados Laura e Danilo***

***Meus sobrinhos Catarina, Cecília, Antônio, Felipe (In memorian) e Artur***

***Minha esposa Fernanda***

***Meus filhos Gael e Luísa***

## **Agradecimentos**

Aos pacientes que contribuíram com este trabalho.

À Profa.Dra Maria Luiza Moretti pela orientação e dedicação na realização desta tese.

Ao Prof.Dr Reinaldo Salomão pela co-orientação e apoio constantes.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular da UNICAMP.

Aos colegas do laboratório de Imunologia da Disciplina de Infectologia da UNIFESP/EPM.

Ao Prof.Dr Plínio Trabasso, pela contribuição na tese e pela oportunidade de ingressar como membro da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HC-UNICAMP.

À Profa.Dra Mariangela Ribeiro Resende pela contribuição na tese e apoio constantes nesta jornada.

À equipe da CCIH, Renata, Mirtes, Sônia, Tiago, Eliane pela compreensão, amizade e apoio

Aos colegas da Seção de Epidemiologia Hospitalar.

Aos amigos irmãos Luís Gustavo, Christian, Rodrigo, Falcão, Felício Alcione e Guilherme, por tudo.

## RESUMO

**Introdução:** O diagnóstico da candidíase invasiva (CI) permanece sendo um dos principais desafios do manejo dessa condição e o polissacarídeo 1-3- $\beta$ -D-Glucana (BDG) foi identificado como um biomarcador útil. Contudo, ainda existem dúvidas sobre a melhor forma de utilização do biomarcador na população de pacientes críticos. A CI geralmente ocorre em pacientes que já apresentaram perturbação da homeostase imunológica. A mensuração de citocinas pode fundamentar uma análise exploratória de diversos aspectos da resposta imune, útil para a compreensão da gênese e do desfecho dos episódios sépticos e de CI.

**Métodos:** Estudo descritivo, observacional, prospectivo, que incluiu pacientes sépticos com fatores de risco para CI e pacientes com diagnóstico estabelecido de CI. Amostras de sangue para dosagem de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-17A, IL-10, IL-4), proteína C reativa e de BDG foram coletadas segundo um cronograma pré-estabelecido. O cronograma de coletas foi interrompido nos casos de óbito ou alta hospitalar. As informações clínicas foram registradas e todos os pacientes incluídos no estudo foram seguidos até o desfecho da internação (alta hospitalar ou óbito).

**Resultados:** Foram incluídos 59 pacientes, e foram coletadas 207 amostras de sangue. Trinta e sete pacientes eram homens (62,7%). A mediana de idade foi de 55,3 anos. Os pacientes foram divididos em três grupos: CI confirmada - crescimento de amostras clínicas para *Candida*; CI provável - BDG >80pg/ml em amostras do dia da inclusão e dia seguinte à inclusão e culturas negativas para *Candida*; e CI afastada - BDG <80pg/ml em amostras do dia da inclusão e/ou dia seguinte à inclusão e culturas negativas para *Candida*. A mortalidade geral observada foi de 45,7%, sem diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos de pacientes (IC: 45,8%, CI provável: 58%, CI afastada: 39%; p=0,55). Os níveis de BDG foram significativamente mais elevados em pacientes com candidíase confirmada ou provável, em relação aos pacientes com candidíase afastada (328pg/mL vs. 45pg/mL; p <0,001 e 247pg/mL vs. 45 pg/mL; p=0,005 respectivamente). Não foram observadas oscilações significativas das concentrações de BDG ao longo dos 14 dias. As dosagens de citocinas não apresentaram variações significativas em função da presença ou ausência de etiologia fúngica. Houve associação entre mortalidade intra-hospitalar e valores

mais altos e estáveis do score de SOFA ( $P=0.02$ ) e níveis mais elevados de IL-10 ( $P=0.03$ )

**Conclusão:** A BDG é um biomarcador útil na população de pacientes críticos e o ponto de corte de 80pg/mL permitiu a identificação de um subgrupo de pacientes que potencialmente se beneficiaria de terapia antifúngica. No entanto, o lento clearance do biomarcador limita sua utilização como uma ferramenta de avaliação da eficácia do tratamento antifúngico. Não houve associação entre as concentrações de citocinas mensuradas e a etiologia fungica. No que diz respeito ao desfecho dos quadros sépticos, pudemos observar que tanto citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias possuem potencial impacto no prognóstico dos pacientes com sepse. Dentro de um contexto de grande disfunção imune, a magnitude da resposta “anti-inflamatória”, aferida principalmente pelas concentrações da IL-10, esteve associada a maior mortalidade intra-hospitalar.

**Palavras-Chave:** Candidíase Invasiva, Candidemia, sepse, (1-3)- $\beta$ -D Glucan, Citocinas, IL-10.

## ABSTRACT

**Introduction:** Early diagnosis remains as a major challenge for Invasive Candidiasis (IC) management and 1-3- $\beta$ -D-Glucan (BDG) is a useful biomarker. Nevertheless, there are still some doubts about its use in critical patients. Invasive Candidiasis usually occurs in patients with previous immune homeostasis disorders. Cytokines measurement may support an exploratory initial approach to the genesis and results of IC and other septic events .

**Methods:** It is a descriptive, prospective and observational study that included septic patients with risk factors for IC and patients with IC. Blood samples were collected for cytokines measurement (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-17A, IL-10, IL-4), C - reactive Protein and BDG to an established schedule. Blood samples were discontinued in cases of death or discharge. Clinical information were registered and all patients were followed until end of hospitalization (death or discharge).

**Results:** Fifty-nine patients were included and 207 blood samples were collected. Thirty seven patients were men and the median age was 55,3 years. Patients were assigned to three groups: confirmed IC – positive culture from a clinical specimen for *Candida* spp.; probable IC – BDG >80pg/mL on days zero and one and negative cultures for *Candida*; and non-IC – BDG < 80pg/mL on days zero and one and negative cultures for *Candida*. The overall mortality rate was 45.7 %, without significant difference among the three groups of patients (IC: 45.8%, probable IC: 58% and non-IC: 39%; p= 0.55). BDG mean levels were higher in IC and probable-IC than in non-IC patients (328pg/mL vs. 45pg/mL; p <0.001 and 247pg/mL vs. 45 pg/mL; p=0.005 respectively). No significant variation or decrease in serum levels of BDG occurred from days zero and one, to days seven and 14 (p=0.89). Cytokines' profiles were not associated with

fungal etiology. Hospital mortality was independently associated to higher and stable SOFA values over time ( $p=0.02$ ) and IL-10 levels ( $p=0.03$ ).

**Conclusion:** BDG is a useful biomarker in the critically ill patient population and the cut-off point of 80pg / mL allowed the identification of a subgroup of patients who would potentially benefit from antifungal therapy. However, the slow clearance of the biomarker limits its use as a tool for evaluating the efficacy of antifungal treatment. There was no association between measured cytokine concentrations and fungal etiology. Regarding the outcome of septic patients, we could observe that both proinflammatory and anti-inflammatory cytokines have a potential impact on the prognosis of patients with sepsis. Within a context of major immune dysfunction, the magnitude of the "anti-inflammatory" response, measured mainly by IL-10 concentrations, was associated with higher in-hospital mortality.

**Keywords:** Invasive Candidiasis, Candidemia, Sepsis, (1-3)- $\beta$ -D Glucan, Cytokines, IL-10.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Características gerais da população divididas por grupos de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)
- Tabela 2** Uso prévio de modalidades terapêuticas dividido por grupos de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)
- Tabela 3** Detalhamento dos casos de Candidíase Invasiva
- Tabela 4** Variação da 1-3- $\beta$ -D-Glucan em função do grupo de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)
- Tabela 5** Comparação múltipla das concentrações de 1-3- $\beta$ -D-Glucan entre os diferentes grupos de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)
- Tabela 6** Média estimada de 1-3- $\beta$ -D-Glucan por classificação (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada) e por tempo (D0, D1, D7 e D14)
- Tabela 7** Porcentagem de pacientes com 1-3- $\beta$ -D-Glucan positiva em função do uso prévio de modalidades terapêuticas
- Tabela 8** Análise multivariada de fatores associados à presença de culturas positivas para *Candida* sp
- Tabela 9** Variação das concentrações de citocinas ao longo do tempo
- Tabela 10** Concentração média das citocinas nos diferentes grupos de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)
- Tabela 11** Concentração média das citocinas agrupando os pacientes com Candidíase confirmada e provável em comparação com o grupo de pacientes com Candidíase afastada
- Tabela 12** Análise multivariada de fatores relacionados a óbito intra-hospitalar
- Tabela 13** Análise multivariada de fatores relacionados a óbito intra-hospitalar levando em consideração a variação individual do SOFA ao longo do tempo
- Tabela 14** Razões de chance (odds ratio) de óbito em função dos valores do SOFA e da concentração de IL-10 ao longo do tempo

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>APACHE II</b>	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
<b>APC</b>	Alofocianina
<b>APC-Cy7</b>	Alofocianina conjugada com corante cianina 7
<b>BDG</b>	1-3- $\beta$ -D-Glucan
<b>BD</b>	<i>Becton-Dickinson®</i>
<b>CA</b>	<i>California</i>
<b>CAGTA</b>	<i>Candida albicans germ-tube antibody</i>
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CI</b>	Candidíase Invasiva
<b>CMC</b>	Candidíase crônica muco cutanea
<b>CVC</b>	Cateter Venoso Central
<b>D0</b>	Dia zero (dia da inclusão dos pacientes no estudo)
<b>D1</b>	Dia um (um dia após a inclusão dos pacientes no estudo)
<b>D7</b>	Dia sete (sete dias após a inclusão dos pacientes no estudo)
<b>D14</b>	Dia 14 (14 dias após a inclusão dos pacientes no estudo)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EORTC</b>	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>Fg</b>	Fentogramas
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IC</b>	Índice de Colonização
<b>ICC</b>	Índice de Colonização Corrigido
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-2</b>	Interleucina 2

<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-9</b>	Interleucina 9
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-17A</b>	Interleucina 17A
<b>IL-17F</b>	Interleucina 17F
<b>IL-18</b>	Interleucina 18
<b>IL-22</b>	Interleucina 22
<b>IL-23</b>	Interleucina 23
<b>JICA</b>	Japan International Cooperation Agency
<b>KCL</b>	Cloreto de potássio
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>μL</b>	Microlitros
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>NC</b>	<i>North Carolina</i>
<b>NFκβ</b>	Fator nuclear kappa beta
<b>Nk</b>	<i>Natural Killers</i>
<b>PAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<b>PCR</b>	Proteína C Reativa
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>Pg</b>	Picogramas
<b>Ph</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PRRs</b>	Receptores de Reconhecimento de Padrões
<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i>
<b>SOFA</b>	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Transformação de Crescimento beta
<b>Th</b>	Linfócitos T Helper
<b>TLR</b>	Toll Like Receptors
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônias
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VM</b>	Ventilação mecânica

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
<b>3.1 LOCAL DA PESQUISA</b> .....	25
<b>3.2 DESENHO DO ESTUDO</b> .....	25
<b>3.3 POPULAÇÃO</b> .....	27
<b>3.3.1 Critérios de inclusão:</b> .....	27
<b>3.3.2 Critérios de exclusão:</b> .....	28
<b>3.4 MÉTODOS</b> .....	28
<b>3.4.1 Procedimentos laboratoriais:</b> .....	28
<b>3.4.2 Detecção de (1,3)-<math>\beta</math>-D-Glucana (BDG):</b> .....	28
<b>3.4.3 Dosagens das citocinas:</b> .....	29
<b>3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	29
<b>3.6 DEFINIÇÕES</b> .....	31
<b>3.7 ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	32
<b>3.8 SUPORTE FINANCEIRO</b> .....	32
<b>3.9 REFERÊNCIAS E CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	33
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	69
<b>7. ANEXOS</b> .....	78
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

### - Candidemia, Candidíase Invasiva e os desafios diagnósticos:

Os fungos do gênero *Candida* podem causar um grande espectro de quadros clínicos, que variam desde infecções mucosas superficiais até doença invasiva com altas taxas de mortalidade. Em relação às espécies envolvidas nos casos de Candidíase invasiva (CI), cinco espécies são responsáveis por quase a totalidade dos casos. São elas: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (1). As taxas de mortalidade relacionadas aos episódios de CI são consideravelmente altas e variam de acordo com as características da população estudada, podendo alcançar taxas superiores a 50% na população de pacientes críticos (2,3,4,5,6). Uma análise retrospectiva de todos os casos de candidemia nos EUA no ano de 2000 identificou um incremento de 14,5% na mortalidade de adultos acometidos pela infecção (7). O pronto diagnóstico e o estabelecimento precoce e correto de terapêutica específica são fundamentais para que se obtenha desfecho clínico favorável (3,8). No entanto, o diagnóstico da CI permanece sendo um dos principais desafios do manejo dessa condição na prática clínica diária.

A CI pode se manifestar como candidemia isoladamente, como candidemia associada à candidíase profunda ou como candidíase profunda isoladamente. O diagnóstico definitivo da CI é estabelecido quando ocorre crescimento de fungos do gênero *Candida* em amostras de hemoculturas ou em amostras clínicas obtidas sob condições assépticas de materiais normalmente estéreis e que apresentem correlação com o quadro clínico apresentado pelos pacientes em investigação. As amostras de hemoculturas conseguem detectar a presença do fungo desde que exista, ao menos, 1 unidade formadora de colônia (UFC)/mL. Essa concentração de 1 UFC/mL corresponde a aproximadamente  $5,6 \times 10^3$  UFC no volume sanguíneo corporal total de um adulto. Logo, pode-se obter culturas negativas caso a concentração de *Candida* viável na circulação seja inferior ao limite de detecção do método na amostra obtida, ou em casos de candidemia transitória. Além disso, as hemoculturas não serão efetivas para o diagnóstico de candidíase profunda quando ela não for acompanhada por candidemia ao menos transitória (9). Alguns estudos avaliaram a positividade de amostras de hemoculturas para *Candida* em

pacientes com diagnóstico de CI estabelecido por achados de necropsia. Houve relatos de sensibilidade de 50% (10) e 21% (11), com potencial influência do uso de terapia antifúngica no desempenho da hemocultura (11). Culturas obtidas de tecidos normalmente estéreis por procedimentos com técnica asséptica são invasivos e nem sempre disponíveis. Além disso, todos os métodos de diagnóstico que se baseiam no crescimento de *Candida* em culturas requerem tempo e não fornecem as respostas com a agilidade que muitas vezes é necessária no cuidado dos pacientes gravemente enfermos. Em uma análise retrospectiva de Morrel e cols. (12), o retardo do início da terapia antifúngica até que se obtivessem resultados definitivos das culturas foi identificado como potencial causa para aumento na mortalidade dos casos de candidemia.

Desta forma, os serviços de terapia intensiva buscam formas de identificar os pacientes que potencialmente se beneficiariam de terapia antifúngica antes da liberação final do resultado das culturas ou a despeito de sua negatividade. Em 1994, foi proposto o cálculo do Índice de Colonização (IC) e do Índice de Colonização Corrigido (ICC), por Pittet e cols. (13). Desenvolvido em UTIs cirúrgica e neonatal, esse método permitiu identificar a colonização por *Candida* como um fator de risco para posterior desenvolvimento de CI. No entanto, além de ter sido validado para populações específicas de pacientes, os cálculos do IC e ICC envolviam uma vigilância ativa específica, com coleta de culturas de vigilância duas vezes por semana, o que dificulta sua aplicabilidade na prática clínica. Através da análise dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de CI, um estudo de prevalência espanhol que incluiu pacientes com mais de sete dias de internação em UTIs clínico-cirúrgicas, foi proposto o *Candida score* (14). Esse escore leva em conta a existência de fatores de risco, a presença de quadro clínico compatível com infecção e evidências de colonização para identificar pacientes candidatos a receber terapia antifúngica. Em estudo multicêntrico, prospectivo, a incidência de CI em pacientes com *Candida score* < 3 foi inferior a 5% (15). De forma semelhante ao IC, o *Candida score* também envolve a realização de culturas seriadas de vigilância de vários sítios corporais. Ostrosky-Zeichner e cols. (16) propuseram uma regra preditiva exclusivamente clínica (portanto, sem a necessidade de coleta de culturas de vigilância), baseada na análise retrospectiva de uma série de casos de pacientes internados em UTIs americanas e brasileiras. Embora de aplicação mais simples, essa regra

preditiva foi utilizada em um estudo prospectivo, randomizado e duplo-cego, com o objetivo de avaliar a eficácia do uso de caspofungina profilática e para tratamento preemptivo para pacientes críticos e considerados de alto risco para desenvolvimento de CI. O estudo não permitiu conclusões definitivas sobre a estratégia de tratamento preemptivo. Houve redução não significativa da incidência de CI no grupo que recebeu profilaxia, sem diferenças em relação à mortalidade, tempo de internação na UTI ou uso de antifúngicos (17). Portanto, estratégias terapêuticas adotadas em uma população identificada através dessa regra preditiva clínica tiveram pouco ou nenhum impacto no desfecho dos pacientes, o que evidencia a aplicabilidade restrita da referida regra.

Diante de todas estas limitações diagnósticas, ocorreu a busca por biomarcadores que pudessem contribuir para a agilidade e a precisão do diagnóstico de CI, bem como de outras infecções fúngicas. Componente exclusivo da parede celular dos fungos, o polissacarídeo 1-3- $\beta$ -D-Glucana (BDG) foi identificado como um biomarcador útil para diagnósticos de diversas micoses profundas e invasivas, em diversos cenários clínicos e para diferentes populações de pacientes (18,19,20,21,22,23).

Embora esteja mencionado como método diagnóstico adjuvante de CI em documentos de consenso amplamente utilizados na prática clínica (1,24), ainda existem incertezas em relação ao uso desse biomarcador no cenário da terapia intensiva, concernentes, por exemplo, à sua cinética, à interferência de diversas modalidades terapêuticas em seus níveis, às suas implicações prognósticas e à melhor forma de utilização na prática clínica (25). Neste sentido, uma análise descritiva dos níveis de BDG em pacientes críticos, em um cenário de vida real, pode ser útil para estabelecer a melhor forma de utilização do biomarcador na UTI e as limitações e cuidados na interpretação dos níveis séricos encontrados nesta população de pacientes.

#### **- Resposta Imune e Candidíase Invasiva (CI)**

Os fungos do gênero *Candida* podem fazer parte da microbiota dos indivíduos saudáveis, atuando como agentes comensais. A vigilância constante do sistema imune é fundamental para impedir o aparecimento de infecções por *Candida* (26,27). O funcionamento da resposta imune é extraordinariamente complexo e envolve diversas interações entre os microrganismos e o hospedeiro. A atuação do sistema imune nos quadros sépticos, desde o

reconhecimento dos patógenos invasores até as complexas vias de sinalização celular, em grande parte deriva do conhecimento adquirido nos estudos envolvendo o Lipopolisacarídeo (LPS) das bactérias Gram negativas, embora possua aspectos comuns para os diferentes agentes etiológicos, inclusive para fungos do gênero *Candida* (28).

Resumidamente, podemos afirmar que a resposta imune se inicia com o reconhecimento, por parte das células do sistema imune inato, de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através da ligação com receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os *Toll-like receptors* (TLR), receptores do tipo Lectina e os NOD-LRRs (28). No caso específico das infecções por *Candida*, os PRRs mais importantes são os receptores do tipo Lectina, que reconhecem os componentes de parede celular  $\beta$ -1,3-glucana e  $\beta$ -1,6-glucana (27). A partir desse reconhecimento, diversas vias de sinalização intracelular são ativadas, culminando na ativação do fator nuclear Kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$ B) e na formação do inflamossoma, resultando na ativação da caspase 1 e produção da IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 $\beta$ ) e IL-18. A partir daí, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, importantes para o controle efetivo do patógeno invasor e também envolvidas em outras vias de sinalização, bem como na lesão tecidual observada nos processos infecciosos (28).

Os antígenos, processados pelas células apresentadoras de antígenos, são então apresentados aos linfócitos, associados às moléculas MHC das classes I e II, dando início à resposta imune adaptativa. Existem diferentes subpopulações linfocitárias que exercem papéis distintos e complementares na defesa do organismo contra agentes invasores. Os linfócitos T CD8+, conhecidos como linfócitos citotóxicos, reconhecem antígenos citosólicos ligados às moléculas MHC tipo I e, a partir desse reconhecimento, induzem a apoptose de células mutadas ou infectadas com patógenos intracelulares (28).

Os linfócitos T helper (Th) expressam CD4 em sua superfície e reconhecem antígenos apresentados por moléculas do MHC II, presentes exclusivamente nas células apresentadoras de antígeno. Os linfócitos Th0 se diferenciam em Th1 sob influência da IL-12. Essa subpopulação linfocitária produz IFN- $\gamma$  e IL-2. Essas citocinas exercem feedback positivo sobre as células apresentadoras de antígenos e determinam aumento do poder microbicida da resposta (ativação de fagócitos, células NK e linfócitos T CD8+). A subpopulação

Th2 é formada a partir de influência da IL-4. É produtora de IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que determinam a produção de anticorpos e que promovem modulação da resposta imune. A IL-10, por exemplo, inibe a secreção de citocinas do fenótipo Th1, determinando inibição da ativação de macrófagos e células T CD8+. A IL-1 $\beta$ , IL-6 e o TGF- $\beta$  estimulam a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th17. Essa subpopulação linfocitária produz IL-17 (grupo de proteínas homólogas, classificadas como IL-17 A-F) e IL-22. A IL-17 estimula a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e outras citocinas inflamatórias, recruta neutrófilos e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumentando o poder microbida da resposta imune. Os linfócitos T reguladores expressam as proteínas de superfície CD4 e CD25. Secretam moléculas como IL-9 e IL-10 e inibem funcionalmente os macrófagos, os linfócitos T CD8+ e as células NK, sendo de fundamental importância para a manutenção da homeostase imunológica (28).

A via de sinalização da IL 17 é especialmente importante no combate das infecções por fungos do gênero *Candida* ao nível das mucosas. As células epiteliais e apresentadoras de antígeno, através do reconhecimento da *Candida* pelos receptores do tipo Lectina, ativam o NF- $\kappa$ B com a participação do complexo proteico de sinalização CARD9/BCL10. Isso resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TGF- $\alpha$ . Estas induzem a diferenciação de Linfócitos Th0 em linfócitos Th17 com a participação do fator de transcrição STAT 3. Esses linfócitos produzem IL-17 e IL-23, que recrutam neutrófilos com grande poder microbida para as mucosas e determinam a produção de defensinas e outros peptídeos com atividade microbiana, também secretados ao nível das mucosas. Diversas mutações, com diversos padrões de herança genética, resultam em menor produção de IL-17 ou alterações nas vias de sinalização mencionadas acima e levam à candidíase mucocutânea crônica (CMC). A síndrome de Job ou síndrome de Hiper IgE (perda de função do fator de transcrição STAT3) é um exemplo de uma dessas condições. Esses pacientes não costumam apresentar episódios de CI em uma frequência muito maior do que aquela observada na população em geral, sugerindo que a resposta imune aos fungos do gênero *Candida* é compartimentalizada (26,27,29). Existem evidências que apontam, inclusive, para diferenças nas respostas imunes observadas ao nível da mucosa vaginal, quando comparadas

à mucosa oral, por exemplo. Na mucosa vaginal, a resposta adaptativa Th17 aparentemente não contribui para a proteção contra episódios locais de infecção, ao passo que esse padrão de resposta é fundamental para a proteção contra os episódios de candidíase oral (26,27). Mutações no gene da CARD 9 presentes em uma família determinaram um menor número de células Th17 com conseqüente maior suscetibilidade à candidíase mucocutânea e, potencialmente, maior suscetibilidade a desenvolver apresentações invasivas de Candidíase (30). O comprometimento da capacidade microbicida dos neutrófilos observada em outro relato de CI relacionada à deficiência de CARD 9 pode explicar a maior suscetibilidade a formas invasivas de candidíase, contrariamente ao que se observa em mutações genéticas que comprometem a via de sinalização da IL-17 em outros pontos (31). Além disso, a resposta imune à *Candida* também varia em função de aspectos morfológicos do fungo. Ao nível das mucosas, o sistema imune estabelece um modelo de tolerância imunológica às leveduras, configurando o estado de colonização do hospedeiro pelo fungo. A formação de hifas parece ser um passo fundamental no processo de invasão tecidual e desperta vigorosa reação do sistema imune (32). A *C. glabrata* não forma hifas e existem, possivelmente, particularidades na atuação do sistema imune diante da infecção por fungos dessa espécie (27).

Nota-se, portanto, que a resposta imune a *Candida* possui diversas particularidades além de diversos aspectos ainda não totalmente elucidados. Os aspectos imunológicos envolvidos na gênese dos episódios de CI, especialmente na população de pacientes críticos, são pouco conhecidos.

### ***Candida* – um agente oportunista em pacientes sépticos?**

Os quadros sépticos são caracterizados pela resposta sistêmica mal adaptada do hospedeiro a agentes infecciosos, em um contexto de grande disfunção imune. Embora, durante muito tempo, os quadros sépticos tenham sido compreendidos como um processo dinâmico que caminhava de um polo inicial de grande predomínio pró-inflamatório para um polo final de anergia e imunossupressão, a percepção mais atual é a de que essas respostas ocorram simultaneamente e são influenciadas por aspectos genéticos, presença de comorbidades e pelo agente agressor (33). Nos últimos anos, desde o lançamento da Surviving Sepsis Campaign, avanços assistenciais importantes foram feitos no manejo destes pacientes, com aumento da sobrevida especialmente na fase

aguda da doença. No entanto, um número significativo de pacientes permanece dependentes de cuidados intensivos e terapias de substituição como ventilação mecânica e hemodiálise, em uma condição de “doença crítica crônica”, de curso mais prolongado (“sepsis prolongada” ou “protracted sepsis”). Este estado é caracterizado por infecções recorrentes, desnutrição, disfunção orgânica e déficit cognitivo (34). Gentile e cols propuseram uma definição para esta condição, nomeando-a como “Síndrome da inflamação-imunosupressão e catabolismo persistentes”(35). O manejo desta condição demanda custos e muitos esforços dos serviços de assistência aos pacientes críticos, resultando, muitas vezes, em um processo lento de deterioração clínica e óbito (34). Do ponto de vista fisiopatológico, foram descritas evidências de imunossupressão em pacientes sépticos que evoluíram a óbito (36,37). Alguns autores tentaram correlacionar essas evidências de imunossupressão com o desenvolvimento de infecções nosocomiais, sem, contudo, estabelecer conclusões definitivas (38,39,40).

Na maioria das vezes, *Candida* atua como um agente oportunista, determinando infecções invasivas em pacientes que já apresentaram perturbação da homeostase imunológica, bem como alterações no equilíbrio da microbiota colonizante induzida por uso prévio de antibióticos. Essas condições são difíceis de reproduzir em modelos animais, por exemplo. Nesse sentido, a mensuração de citocinas em populações de pacientes sépticos com e sem CI poderia representar uma análise exploratória inicial útil de diversos aspectos da resposta imune e que potencialmente contribuiria para a compreensão da gênese e do desfecho dos episódios de CI, comparativamente aos episódios de sepsis por outros agentes etiológicos em um cenário de prática clínica diária.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi descrever o comportamento do biomarcadores sérico BDG, utilizado no diagnóstico de infecção invasiva por *Candida* em pacientes sépticos, e contribuir para a compreensão da fisiopatologia dos quadros sépticos que acometem pacientes críticos após sua admissão hospitalar, através da mensuração de citocinas inflamatórias.

### Objetivos específicos

1. Avaliar comparativamente os níveis das dosagens de BDG e sua cinética em pacientes críticos, com sepse prolongada e fatores de risco para infecções invasivas por *Candida* e em pacientes com diagnóstico confirmado de infecções invasivas por *Candida*.

2. Avaliar comparativamente o perfil de citocinas em pacientes críticos, com sepse prolongada e fatores de risco para infecções invasivas por *Candida* e em pacientes com diagnóstico confirmado de infecções invasivas por *Candida*

3. Correlacionar o perfil de citocinas com o desfecho clínico observado (alta ou óbito) na população estudada.

Uma vez que a CI é uma condição relativamente pouco prevalente e que muitas vezes não é identificada pelo principal recurso diagnóstico disponível (culturas), utilizamos o BDG como método diagnóstico adjuvante. Esta estratégia nos pareceu interessante pois permitiu a identificação de um grupo de pacientes nos quais a etiologia fúngica é provável à despeito da negatividade das culturas, algo frequentemente observado no cotidiano. Além disso, pudemos analisar aspectos importantes deste biomarcador que contribuíram para preencher lacunas do conhecimento acerca da utilização deste recurso diagnóstico na população de pacientes críticos.

As hipóteses que pretendíamos testar no presente estudo foram as seguintes:

- A atuação do sistema imune em quadros causados por *Candida* é diferente daquela observada em quadros de sepse prolongada causados por outros agentes etiológicos e estas diferenças podem ser constatadas a partir da dosagem de citocinas inflamatórias.

- O desfecho clínico observado (alta ou óbito) é igualmente influenciado pelo perfil de citocinas, sendo possível associar o óbito a um fenótipo de imunossupressão

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DA PESQUISA

O trabalho foi realizado no Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC-UNICAMP), localizado na cidade de Campinas. Trata-se de um hospital universitário, terciário, referência para uma população aproximada de seis milhões de habitantes na região metropolitana de Campinas. O HC-UNICAMP possui 404 leitos distribuídos entre as diversas especialidades médicas. Tem 50 leitos de UTI, que estão assim distribuídos: UTI geral, UTI pediátrica, UTI do transplante de órgãos sólidos e unidade coronariana, além de unidade de transplante de medula óssea.

#### 3.2 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo descritivo, observacional, prospectivo. Os pacientes foram incluídos em dois momentos distintos:

- Durante internação na UTI, no início da investigação de um novo quadro séptico; **ou**

- Após a detecção de crescimento de *Candida* em amostras periféricas de hemocultura ou em outras culturas de material normalmente estéril, por procedimento realizado com antissepsia adequada, compatível com o quadro clínico apresentado.

Amostras de sangue para realização de dosagem de citocinas, proteína C reativa e de BDG foram coletadas segundo um cronograma pré-estabelecido. Foram coletadas amostras nos dias zero (D0), um (D1), sete (D7) e 14 (D14) após a inclusão. O cronograma de coletas foi interrompido nos casos de alta hospitalar ou óbito.

Foram realizadas dosagens das seguintes citocinas:

- IL-1 $\beta$
- IL-2
- IL-6
- TNF $\alpha$
- IFN- $\gamma$
- IL-12
- IL-17A

- IL-10
- IL-4

O objetivo do estudo era o de realizar uma análise exploratória inicial que contemplasse as respostas imunes inata (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6) e adaptativa, inclusive das subpopulações linfocitárias (Th1, Th2, Th 17 e Treg) envolvidas nesta última. Desta forma, citocinas representativas dos padrões Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL10), Th 17 (IL-17A) e Treg (IL-10) foram incluídas.

Todos os pacientes incluídos no estudo foram seguidos até o desfecho da internação (alta hospitalar ou óbito).

As seguintes variáveis clínicas foram registradas:

- Idade
- Sexo
- Motivo de internação na UTI
- Comorbidades (Diabetes mellitus, doença cardiovascular, hepatopatia crônica, pneumopatia crônica, nefropatia crônica e neoplasia)
- Uso prévio de antibióticos
- Uso de dispositivos invasivos prévios à inclusão no estudo (ventilação mecânica, acesso vascular central, cateter vesical de demora)
- Uso prévio de Hemodiálise
- Uso prévio de nutrição parenteral
- Cirurgia abdominal prévia
- Uso de hemoderivados
- APACHE II (Acute Physiology Age Chronic Health Evaluation II)
- SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) - calculado seguindo o mesmo cronograma de coletas de amostras de sangue
- Culturas positivas para fungos
- Terapia antifúngica
- Desfecho ao final da internação

### 3.3 POPULAÇÃO

Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos e do sistema informatizado do hospital e coletados desde o dia da internação dos pacientes até a data do óbito ou saída da instituição.

O período de inclusão dos pacientes se estendeu de janeiro de 2013 a julho de 2015 e os pacientes foram incluídos de forma não consecutiva.

#### 3.3.1 Critérios de inclusão:

- Pacientes sépticos a partir do quinto dia de internação na UTI e expostos previamente à antibióticos **OU**
- pacientes sépticos, com candidemia ou outras formas de CI, incluídos por ocasião da positividade das amostras para fungos do gênero *Candida*.

Por ocasião da inclusão dos pacientes no estudo, foram aceitos como elegíveis pacientes classificados em sepse, sepse grave ou choque séptico, de acordo com os critérios vigentes à época da inclusão. Posteriormente foram adotados novos critérios internacionais de classificação dos pacientes sépticos (41,42). A exposição prévia a antibióticos foi definida como uso sustentado por período superior a 48 horas de qualquer uma das drogas listadas a seguir: combinações de penicilina + inibidores de beta lactamase, cefalosporinas de terceira e quarta geração, carbapenêmicos, quinolonas, polimixinas e glicopeptídeos. A intenção dos pesquisadores era a de incluir pacientes com fatores de risco para CI. Regras preditivas que envolvem culturas de vigilância não foram utilizadas por limitações logísticas. Regras preditivas estritamente clínicas são limitadas e valorizam aspectos como imunossupressão e neutropenia, que influenciariam as conclusões acerca da resposta imune. Desta forma, foi elaborado um critério aplicável a uma população geral de pacientes críticos, potencialmente adequado para identificar pacientes nos quais a etiologia fúngica deveria ser considerada e sem fatores influenciadores da resposta imune. Uma vez que a CI é uma condição relativamente pouco prevalente, de forma a constituir uma grupo sabidamente portador de candidíase invasiva, pacientes sépticos, com candidemia ou outras formas de CI, foram incluídos.

### 3.3.2 Critérios de exclusão:

- Pacientes com idade inferior a 15 anos de idade
- Gestantes
- Pacientes em uso de drogas imunossupressoras
- Receptores de transplantes (de medula óssea ou de órgãos sólidos)
- Portadores de infecção pelo HIV
- Pacientes neutropênicos

## 3.4 MÉTODOS

### 3.4.1 Procedimentos laboratoriais:

#### 3.4.2 Detecção de (1,3)- $\beta$ -D-Glucana (BDG):

A detecção de BDG foi realizada para as amostras de soro coletadas com o kit Fungitell<sup>®</sup> (Associates of Cape Cod Inc., East Falmouth, MA, USA). A seguinte sequência de procedimentos foi realizada:

- Tratamento de 5 $\mu$ L do soro com uma mistura contendo 10 $\mu$ L de 1,2M KCl e 10 $\mu$ L de 0,25M KOH. O reagente alcalino é capaz de converter glucana de fita tripla em fita única, que reage melhor à análise, enquanto o elevado pH permite a desativação de proteases de serina e seus inibidores no soro, os quais fornecem falsos positivos e falsos negativos, respectivamente.
- Incubação a 37°C por 10min.
- Adição em cada placa de soluções padrão de glucana nas concentrações 500, 250, 125, 62,5 e 31pg/mL, além do controle negativo.
- Adição de 100 $\mu$ L do reagente Fungitell<sup>®</sup> em cada poço contendo amostras e controles.
- Leitura das placas a 405nm por 40min em leitora de placa EL808 (Biotek).
- Valores de BDG menor ou igual a 60pg/mL foram considerados negativos, enquanto valores maiores que 80pg/mL foram considerados positivos para infecção. A faixa entre 61 e 79pg/mL foi interpretada como indeterminado.

### 3.4.3 Dosagens das citocinas:

Foram realizadas dosagens plasmáticas das seguintes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-12, IL-17A, IL-10, IL-4 pelo método *Citometric Bead Array*.

Foram coletadas amostras de sangue em tubo com EDTA. Após centrifugação, amostras de plasma foram armazenadas a -80°C.

As dosagens de citocinas foram realizadas utilizando o teste citométrico CBA da Becton & Dickinson (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

O sistema *Citometric Bead Array* (CBA) utiliza a amplificação da detecção de fluorescência por citometria de fluxo para mensurar proteínas solúveis. Cada partícula no CBA proporciona uma superfície de captura para uma proteína específica, semelhante à placa de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), permitindo analisar um pequeno volume de amostra.

O sistema usa uma única população de partículas, de mesmo tamanho e complexidade, mas com intensidades de fluorescências distintas e revestidas com anticorpos de captura específicos para proteínas solúveis. A cada população de partículas é designada uma posição alfa-numérica no citômetro de fluxo, de acordo com a intensidade de fluorescência alofocianina (APC) e alofocianina conjugada com corante cianina 7 (APC-Cy7). Partículas com diferentes posições podem ser combinadas em ensaios para criar um ensaio multiplex.

A detecção é feita com anticorpos também específicos conjugados com ficoeritrina (PE), possibilitando a identificação de complexos sanduíches. Depois da aquisição das amostras, os resultados foram analisados utilizando-se o programa FCAP Array.

Foi utilizado o Kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Enhanced Sensitivity Master Buffer Kit, conforme as orientações do fabricante. As dosagens foram feitas em fentogramas por ml (fg/ml) no citômetro do laboratório de imunologia da disciplina de infectologia da Universidade Federal de São Paulo.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

No que diz respeito às características da população estudada, foi realizada análise exploratória de dados através de medidas resumo (frequência, porcentagem, média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo). O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os grupos em relação às variáveis numéricas. Os testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher foram usados para comparar os grupos em relação às variáveis categóricas. O nível de significância adotado foi de 5%.

A análise estatística objetivou avaliar os seguintes aspectos:

- Concentrações de BDG em função da presença de culturas positivas para *Candida*.
- Cinética da BDG ao longo do tempo de estudo e suas relações com terapia antifúngica e desfecho clínico.
- Frequência das modalidades terapêuticas (Cirurgia abdominal, Hemodiálise, uso de Penicilina + Inibidor e uso de Hemoderivados), que podem influenciar os níveis de BDG nos pacientes com BDG positiva (valores em D0 e D1 > 80pg/ml) e negativa.
- Associações entre as concentrações de citocinas e infecção por *Candida* sp.
- Comportamento e variações das citocinas e suas respectivas comunalidades nos dias estudados, identificando curvas de tendências das mesmas e correlacionando com diagnóstico (CI confirmada, afastada e provável) e desfecho clínico (alta ou óbito).

Para estes objetivos, as análises basearam-se em:

- Modelo misto para medida repetida (tempos 0, 1, 7 e 14 dias) e resposta contínua, sendo o paciente considerado como efeito aleatório e os demais fatores como efeitos fixos.
- Modelos lineares generalizados mistos, postulando-se a distribuição Binomial (resposta binária), com medida repetida e função de ligação logito.
- Teste Qui-quadrado para igualdade de proporções.

Para os modelos ajustados, além de teste global de significância dos efeitos, caso algum efeito fosse significativo, os níveis de significância foram ajustados para comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível crítico de significância considerado foi de 5% (43,44).

### 3.6 DEFINIÇÕES

- ✓ **Sepse:** Infecção documentada ou suspeita acompanhada dos seguintes critérios:
  - Temperatura  $> 38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$
  - Frequência cardíaca  $> 90$  batimentos por minuto
  - Frequência respiratória  $> 20$  incursões por minuto ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg
  - Leucocitos totais  $< 4.000/\text{mm}^3$  ou  $> 12.000/\text{mm}^3$  ou  $> 10\%$  de formas imaturas
- ✓ **Sepse grave:** Presença de ao menos uma disfunção orgânica, definida pela aplicação do score de SOFA, associada ao quadro séptico. As disfunções são divididas por sistemas orgânicos e graduadas de 0 a 4 conforme o nível de disfunção encontrado. Portanto, apresentaram disfunção orgânica os pacientes que apresentaram, minimamente, pelo menos uma das seguintes condições:
  - Relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  (mmHg/kPa)  $< 400$
  - Trombocitopenia (Plaquetas  $< 150.000/\text{mm}^3$ )
  - Bilirrubinas totais entre 1,2 e 1,9mg/dl
  - Pressão arterial média  $< 70$ mmHg
  - Escala de coma de Glasgow entre 13 e 14
  - Creatinina entre 1,2 e 1,9mg/dl
- ✓ **Choque séptico:** Disfunção circulatória aguda, causado pela infecção e caracterizada pela necessidade de vasopressor para manter uma pressão arterial média acima de 65mmHg após a infusão adequada de fluidos, associada a nível sérico de lactato acima de 2mmol/L.
- ✓ **BDG positiva:** Pacientes com níveis de BDG superiores a 80pg/mL nas amostras dos dias zero e um (D0 e D1).
- ✓ **Candidíase invasiva (CI):** Pacientes com crescimento de fungos do gênero *Candida* em amostra periférica de hemocultura ou em material normalmente estéril, obtido por procedimento realizado com antisepsia adequada, compatível com o quadro clínico apresentado.
- ✓ **Candidíase Invasiva (CI) provável:** Episódio de sepse em paciente com internação em unidade crítica  $> 4$  dias, com uso de antibiótico de amplo espectro há  $> 48$  horas, com BDG positiva (níveis  $> 80$ pg/mL nas

amostras de D0 e D1) e culturas negativas para fungos do gênero *Candida* (com exceção de amostras de urocultura e secreção traqueal ou outras culturas classificadas como compatíveis com colonização).

- ✓ **Candidíase invasiva (CI) afastada:** Episódio de sepse em paciente com internação em unidade crítica > 4 dias, com uso de antibiótico de amplo espectro há > 48 horas, com BDG negativa (concentrações < 80pg/mL nas amostras de D0 ou D1) e culturas negativas para fungos do gênero *Candida* (com exceção de amostras de urocultura e secreção traqueal ou outras culturas classificadas como compatíveis com colonização).

### 3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, com aprovação sem restrições (Protocolo No 003/2011).

### 3.8 SUPORTE FINANCEIRO

Esta pesquisa fez parte de projeto colaborativo, internacional, temático de “Novas tecnologias diagnósticas de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos” da UNICAMP em cooperação com a Universidade de Chiba e com apoio financeiro da Japan International Cooperation Agency (JICA) - Projeto UNICAMP No. 02P-29548-09.

Houve também apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto regular de auxílio à Pesquisa No. 2012/51158-0).

### 3.9 REFERÊNCIAS E CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

As referências e citações bibliográficas estão de acordo com as normas preconizadas pela Faculdade de Ciências Médicas e Biblioteca Central da Unicamp, que adotou as normas dos manuscritos submetidos às revistas biomédicas publicadas pelo grupo Vancouver.

#### 4. RESULTADOS

Foram incluídos 59 pacientes sendo 37 homens (62,7%). Ao todo, 207 amostras de sangue foram coletadas. Em 37 pacientes, foram coletadas as quatro amostras inicialmente previstas no momento da inclusão no estudo. Em 52 pacientes foram coletadas três amostras. Em sete paciente, somente as duas primeiras amostras foram coletadas. A mediana de idade foi de 55,3 anos. A mediana de tempo entre internação hospitalar e inclusão no estudo foi de 13 dias.

Os pacientes foram divididos em três grupos, levando em consideração o desempenho do teste de BDG e os resultados das culturas de materiais nobres para fungos do gênero *Candida* spp. (CI afastada, CI confirmada e CI provável).

A tabela abaixo detalha as características da população estudada levando em consideração a classificação acima.

**Tabela 1.** Características gerais da população de acordo com os grupos de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)

Variável	Candidíase invasiva afastada (N=23)	Candidíase Invasiva confirmada (N=24)	Candidíase invasiva provável (N=12)	Total (N=59)	Valor- p
Mediana de Idade em anos	57 (18-78)	63 (25-84)	47,5 (24-79)	58 (18-84)	0,13
Tempo entre admissão hospitalar e inclusão no estudo, em dias	12 (5,25)	12 (4,49)	9 (5,37)	13(4,49)	0,66
Mediana de APACHE II	14 (4-22)	14 (0-24)	12 (5-21)	14 (0 – 24)	0,25
Presença de Comorbidades					
Cardiopatia	9 (39,1%)	10 (41,7%)	5 (41,7%)	24 (40,7%)	0,98
Pneumopatia	4 (17,4%)	4 (16,7%)	1 (8,3%)	9 (15,3%)	0,81

Hepatopatia	3 (13%)	4 (16,7%)	1 (8,3%)	8 (13,6%)	0,89
Neoplasia	7 (30,4%)	8 (33,3%)	4 (33,3%)	19 (32,2%)	0,97
Nefropatia	0 (0,0%)	4 (16,7%)	0 (0,0%)	4 (6,8%)	0,06
Diabetes	3 (13%)	7 (29,2%)	2 (16,7%)	12 (20,3%)	0,41

A tabela 2 resume as características das populações no que diz respeito às modalidades terapêuticas prévias à inclusão no estudo, nos três diferentes grupos de pacientes. Consideramos o uso das referidas modalidades terapêuticas como presentes nos casos de uso sustentado por período superior a 48 horas previamente à inclusão dos pacientes. Especificamente no que diz respeito ao uso de hemoderivados, consideramos o uso nos sete dias anteriores à inclusão dos pacientes.

**Tabela 2.** Uso prévio de modalidades terapêuticas divididos por grupos de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)

Variável	Candidíase invasiva afastada (N=23)	Candidíase Invasiva confirmada (N=24)	Candidíase invasiva provável (N=12)	Total (N=59)	Valor- p
Uso de CVC	22 ( 95,7%)	22 (91,7%)	12 (100%)	56 (94,9%)	0,8
Uso de VM	22 (95,7 %)	19 (79,2%)	12 (100%)	53 (89,8%)	0,12
Uso de CVD	23 (100%)	23 (95,8%)	12 (100%)	58 (98,3%)	0,48
Uso de NPP	15 (65,2%)	11 (45,8%)	7 (58,3%)	33 (55,9)	0,4
Hemodiálise	8 (35%)	6 (25%)	3 (25%)	17 (29%)	1,0
Cirurgia abdominal	16 (69%)	10 (41,7%)	9 (75%)	35 (59%)	0,19
Uso de Hemoderivados	19 (82,6%)	18 (75%)	10 (83,3%)	47 (79,7%)	0,84
Uso de Penicilina + Inibidor de beta- lactamases	17 (73,9%)	19 (79,2%)	9 (75%)	45 (76,3%)	0,91
Uso de Carbapenêmico	14 (60,9%)	13 (54,2%)	7 (58,3%)	34 (57,6%)	0,9
Uso de Cefalosporinas	3 (13%)	4 (16,7%)	1 (8,3%)	8 (13,6%)	0,89
Uso de Glicopeptídeos	8 (34,8%)	11 (45,8%)	6 (50,5%)	25 (42,4%)	0,6

Uso de polimixinas	6 (26,1%)	7 (29,2%)	2 (16,7%)	15 (25,4%)	0,7
Uso de quinolonas	8 (34,8%)	8 (33,3%)	2 (18,2%)	18 (31%)	0,59

A tabela 3 resume os dados clínicos referentes aos pacientes com diagnóstico confirmado de infecção invasiva por *Candida* sp.

**Tabela 3.** Detalhamento dos casos de Candidíase Invasiva

Paciente	Idade	Sítio de infecção	Crescimento em hemoculturas	Espécie isolada	Terapia antifúngica sequencial	Desfecho	Beta Glucana	Intervalo entre inclusão e desfecho
1	74	Pericardite pós-operatória	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Micafungina Fluconazol	Óbito	+	18 dias
2	54	Empiema pleural pós-operatório	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol Micafungina	Alta	+	48 dias
3	69	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Alta	-	25 dias
4	84	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Alta	-	46 dias
5	58	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Óbito	-	15 dias
6	55	Corrente sanguínea/ Mediastinite	Sim	<i>C. krusei</i> <i>C. albicans</i>	Micafungina	Alta	+	42 dias
7	67	Peritonite	Não	<i>Candida</i> não <i>albicans</i>	Fluconazol	Alta	+	42 dias
8	25	ICS relacionada a cateter	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Alta	+	29 dias
9	70	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Alta	+	20 dias

10	73	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Não	Óbito	+	03 dias
11	79	ICS relacionada a cateter	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Alta	+	18 dias
12	76	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Óbito	-	20 dias
13	65	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol Fluconazol	Óbito	+	10 dias
Paciente	Idade	Sítio de infecção	Crescimento em hemoculturas	Espécie isolada	Terapia antifúngica sequencial	Desfecho	Beta Glucana	Intervalo entre inclusão e desfecho
14	61	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. glabrata</i>	Fluconazol	Alta	+	11 dias
15	64	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Alta	+	76 dias
16	35	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol/ Micafungina	Óbito	+	30 dias
17	62	Peritonite	Não	<i>C. albicans</i> <i>C. krusei</i>	Fluconazol/ Micafungina	Óbito	+	22 dias
18	67	Peritonite	Não	<i>C. krusei</i>	Fluconazol / Micafungina	Óbito	+	53 dias
19	53	Empiema pleural pós esofagectomia	Não	<i>C. krusei</i> <i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Alta	+	68 dias

20	51	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina/ Micafungina/ Fluconazol	Alta	+	26 dias
21	59	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Óbito	-	09 dias
22	69	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Alta	+	43 dias
23	57	Corrente sanguínea	Sim	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Óbito	+	28 dias
24	40	Peritonite	Não	<i>C. krusei</i>	Micafungina	Óbito	-	21 dias

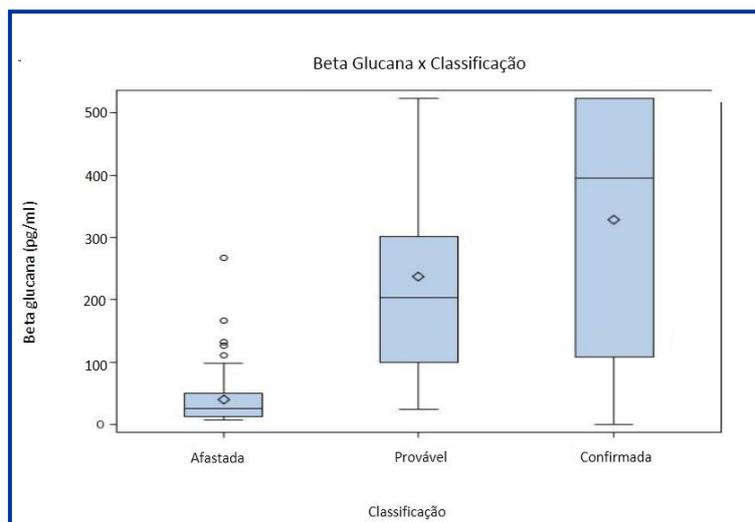
---

A mortalidade geral observada foi de 45,7%. A mortalidade observada nos diferentes grupos (39% para o grupo de candidíase afastada, 45,8% para o grupo de candidíase confirmada e 58% para o grupo de candidíase provável) não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,55$ ). Ao todo, apenas 8 pacientes não fizeram uso de terapia antifúngica ao longo do estudo. O uso de terapia antifúngica não influenciou no desfecho dos pacientes ( $p = 0,71$ ). Dentre os pacientes com diagnóstico de CI, apenas um não fez uso de terapia antifúngica. No grupo de pacientes com CI provável, dois pacientes não receberam terapia antifúngica.

No que diz respeito às concentrações do biomarcador nos diferentes grupos, observamos que os níveis de BDG são significativamente mais elevados em pacientes com candidíase confirmada ou provável, em relação aos pacientes com candidíase afastada, conforme mostrado na tabela abaixo.

**Tabela 4.** Variação da 1-3- $\beta$ -D-Glucan em função do grupo de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada)

Concentração BDG Média em pg/ml (Intervalo de confiança)	Candidíase invasiva confirmada	Candidíase invasiva provável	Candidíase invasiva afastada	Valor-p
Média	328 (270-387)	247(164-331)	45 (<7,6 – 106)	<0,001



**Figura 1.** Bloxpot das concentrações de BDG nos diferentes grupos de pacientes

As concentrações da BDG para os pacientes com candidíase confirmada e afastada ou candidíase provável e afastada foram significativamente distintas. A diferença nas concentrações da BDG observadas nos pacientes com candidíase confirmada e provável, por sua vez, não foi estatisticamente significativa, conforme a tabela abaixo.

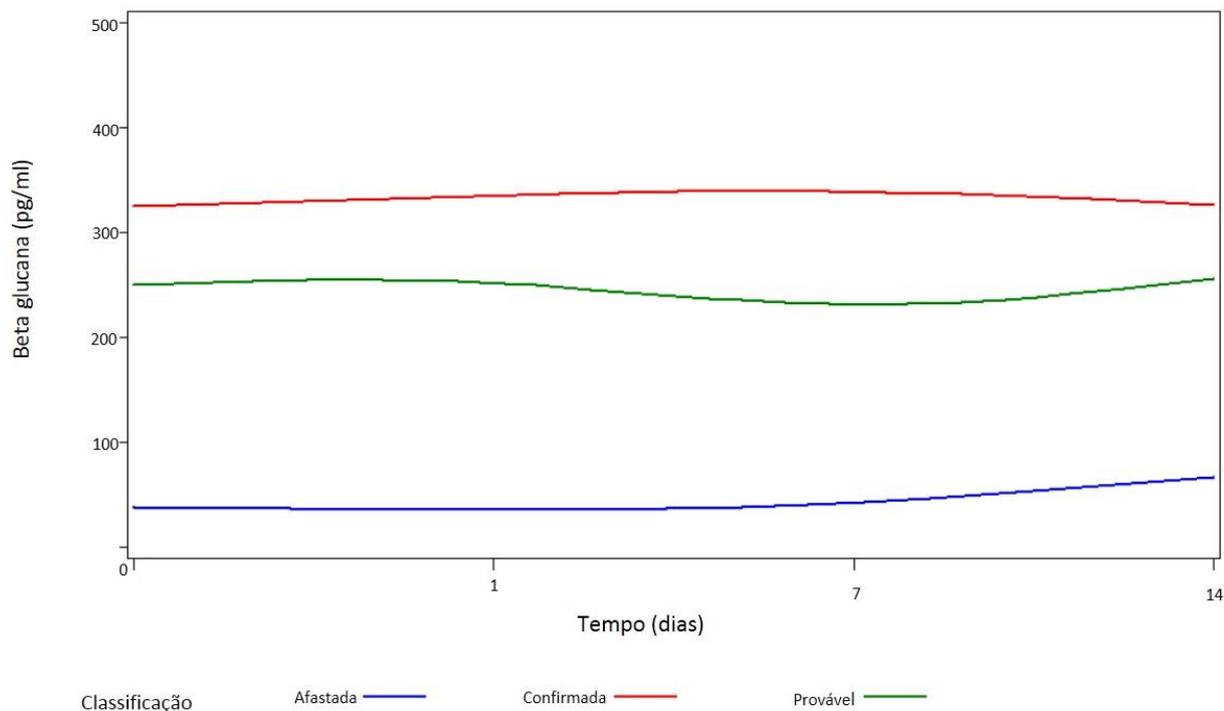
**Tabela 5.** Comparação múltipla das concentrações de BDG entre os diferentes grupos de pacientes (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada).

Classificação Média <i>BDG</i>	Classificação Média <i>BDG</i>	Valor de P
Afastada 45pg/mL	Confirmada 328pg/mL	<0,001
Afastada 45pg/mL	Provável 247pg/mL	0,005
Confirmada 328pg/mL	Provavel 247pg/mL	0,22

Em relação à cinética do biomarcador, observamos que não existem oscilações significativas das concentrações ao longo dos 14 dias de estudo para os diferentes grupos de pacientes.

**Tabela 6.** Média de BDG por classificação (Candidíase invasiva confirmada, provável e afastada) e por tempo (D0, D1, D7 e D14)

Classificação	Tempo	Média (pg/mL)	Intervalo de Confiança Limite inferior	Intervalo de Confiança Limite superior
Afastada	0	37	<7,6	102
Confirmada	0	339	276	402
Provável	0	250	161	340
Afastada	1	35	<7,6	100
Confirmada	1	329	266	392
Provável	1	252	162	341
Afastada	7	42	< 7,6	108
Confirmada	7	331	267	394
Provável	7	232	139	325
Afastada	14	67	< 7,6	139
Confirmada	14	316	250	381
Provável	14	256	162	351



**Figura 2.** Concentrações de BDG ao longo do tempo para os diferentes grupos de pacientes

Para este estudo, portanto, podemos dizer que o nível de BDG se mantém estável ao longo do tempo para as três diferentes classificações e que, dentre os pacientes com culturas negativas para *Candida*, o ponto de corte de 80pg/ml estabelece dois grupos de pacientes com concentrações de BDG estatisticamente diferentes.

As concentrações de BDG podem ser influenciadas por alguns fatores, como cirurgia abdominal, hemodiálise, uso de penicilina + inibidor de beta lactamases ou uso de hemoderivados. Não observamos diferenças significativas nas frequências de uso dessas modalidades terapêuticas entre os pacientes que apresentaram BDG positiva (D0 e D1 > 80) e negativa, conforme explicitado na tabela 7 a seguir.

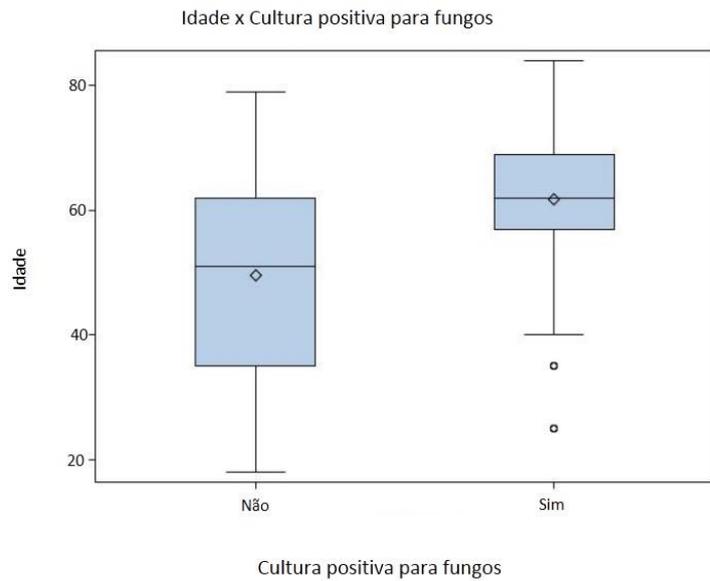
**Tabela 7.** Porcentagem de pacientes com BDG positiva em função do uso prévio de modalidades terapêuticas

<b>BDG</b>	Cirurgia Abdominal Total=35	Hemodiálise Total=17	Uso de Pen + inibidor Total=45	Hemoderivados Total=47
Positiva (29)	16 (55,2%)	8 (27,6%)	22 (75,9%)	23 (79,3%)
Negativa (30)	19 (63,3%)	9 (30%)	23 (76,7%)	24 (80,0%)
Valor-p	0,52	0,83	0,94	0,94

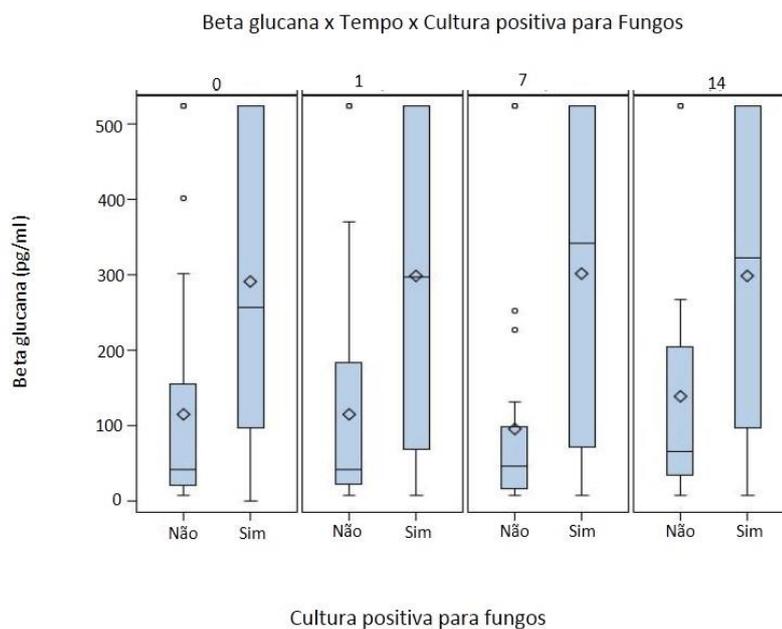
Com o objetivo de identificar quais fatores estão associados à presença da cultura de fungo positiva, ajustamos um modelo linear generalizado misto considerando todos os fatores listados na tabela 8. Idade ( $p=0.0170$ ) e BDG ( $p=0.0145$ ) são aqueles que apresentaram associação significativa com a cultura de fungo positiva. Nota-se que o gênero e as citocinas não mostraram evidência de associação nesta análise.

**Tabela 8.** Análise multivariada de fatores associados à presença de culturas positivas para *Candida* sp

	Cultura positiva para <i>Candida</i> spp	Cultura negativa para <i>Candida</i> spp	Valor-p
IL1 Beta (fg/mL)	809	932	0,67
TNF (fg/mL)	1125	742	0,90
IFN $\gamma$ (fg/mL)	1794	1254	0,94
IL-6 (fg/mL)	187441	148844	0,96
IL-17A (fg/mL)	1527	737	0,42
IL-4 (fg/mL)	553	553	0,60
IL-10 (fg/mL)	11862	8206	0,82
Idade (anos)	62	50	0,01
Genero	F=48% / M=52%	F=26% / M=74%	0,17
BDG (pg/mL)	297	114	0,01
PCR (mg/L)	24	27	0,82



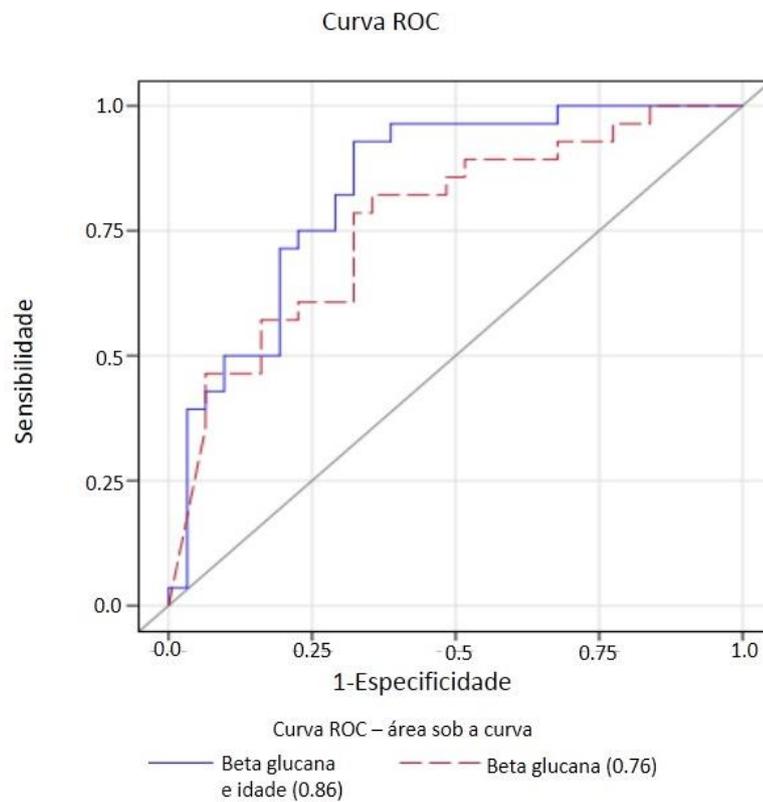
**Figura 3.** Bloxpot da idade para os pacientes com culturas negativas e positivas para *Candida sp*



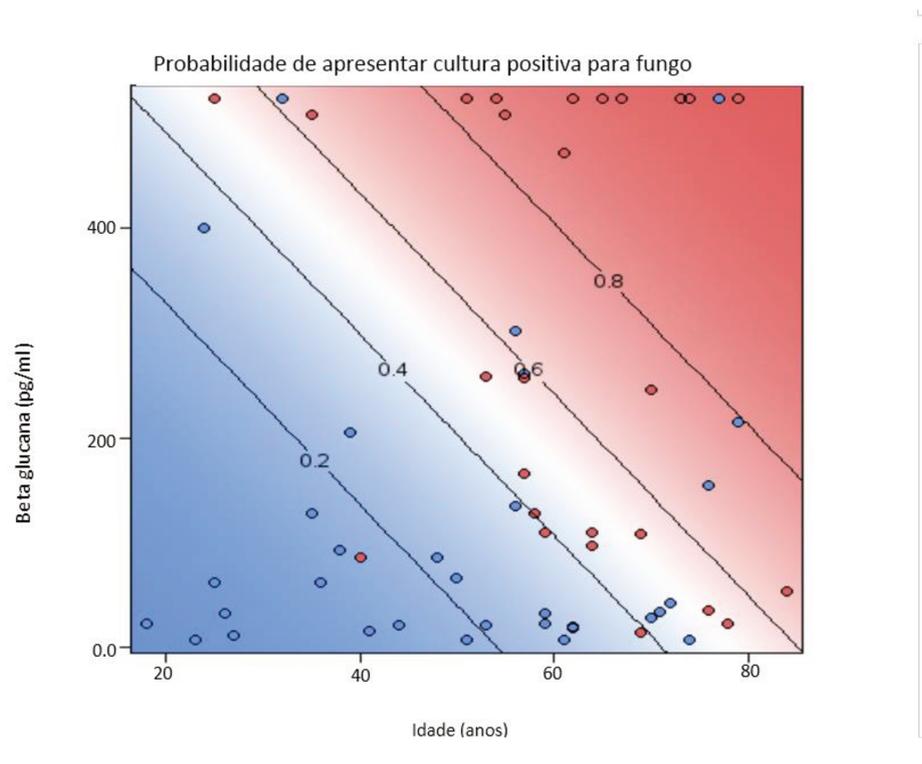
**Figura 4.** Bloxpot dos títulos de BDG para os pacientes com culturas negativas e positivas para *Candida sp*

Após identificados os dois fatores associados à presença da cultura de fungo positiva, construímos a curva ROC (figura abaixo), considerando no ajuste apenas o nível de BDG (modelo simples - linha vermelha) e incluindo o nível de BDG + Idade (modelo completo - linha azul). A inclusão da idade no ajuste

aumenta a área sob a curva de 0,74 para 0,83, mostrando que, para a nossa população de estudo, a presença de culturas positivas para fungos do gênero *Candida* esteve associada a idade mais elevada e níveis maiores de BDG.



**Figura 5.** Curva ROC de BDG e BDG e idade para avaliar positividade das culturas de amostras clínicas para *Candida* sp



**Figura 6.** Faixas de probabilidade de desenvolver cultura positiva para *Candida* sp em função da idade e das concentrações de BDG

No que diz respeito às citocinas, IL-2 e IL-12 foram excluídas da análise uma vez que houve grande número de níveis não detectados dessas citocinas. Não houve variação significativas das diversas citocinas estudados ao longo do tempo de estudo, conforme mostra a tabela 9.

**Tabela 9.** Variação das concentrações de Citocinas ao longo do tempo

Citocina	D0 (Amostras=59)	D1 (Amostras=59)	D7 (Amostras=52)	D14 (Amostras=37)	Valor-p
IL-1 $\beta$	865 (328-1402)	849 (312-1386)	955 (368-1542)	695 (28-1363)	0,93
TNF $\alpha$	1169 (243-2094)	1202 (277-2128)	554 (00-1555)	277 (00 - 1399)	0,33
IFN $\gamma$	1729	1614	1153	1257	0,54

	(1015-2443)	(899-2328)	(377-1929)	(382-2133)	
IL-6	211776 (129871-292680)	125059 (43155-206964)	169678 (80020-259335)	178142 (76451-279833)	0,42
IL-17A	1397 (756-2037)	1295 (654-1936)	755 (71-1440)	512 (00,1258)	0,054
IL-4	707 (467-946)	541 (301-780)	456 (201-711)	447 (166-727)	0,15
IL-10	9944 (3441-16448)	13334 (6830-19837)	11898 (4989-18807)	6963 (00-14519)	0,33
PCR	21 (12-30)	21 (13-30)	34 (24-43)	28 (17-39)	0,13

As dosagens de citocinas não apresentaram variações significativas em função da presença ou ausência de etiologia fúngica. Não foi possível associar a etiologia fúngica da infecção a nenhuma citocina em particular. Mesmo ao agruparmos os pacientes com CI comprovada e provável e compararmos com o grupo de pacientes com CI afastada, não pudemos notar nenhuma associação com significância estatística, conforme mostrado nas tabelas 10 e 11.

**Tabela 10:** Concentração média das Citocinas nos diferentes grupos de pacientes (CI confirmada, afastada e provável)

Citocina	Candidíase Confirmada (Amostras=89)	Candidíase Provável (Amostras=41)	Candidíase Afastada (Amostras=77)	Valor-p
IL-1 $\beta$	614 (75-1153)	613 (00-1402)	1296 (715-1876)	0,18
TNF $\alpha$	463 (00-1489)	658 (00-2147)	1281 (192-2370)	0,54

IFN $\gamma$	1656 (894-2418)	1118 (9-2227)	1541 (728-2354)	0,72
IL-6	202558 (122598-282518)	199130 (81451-316808)	111803 (25043-198564)	0,27
IL-17A	1215 (446-1983)	765 (00-1873)	990 (187,1793)	0,79
IL-4	404 (114-694)	526 (108-944)	682 (378-987)	0,42
IL-10	15163 (7144-23182)	10142 (00-21674)	6299 (00-14685)	0,32
PCR	26 (17-34)	29 (16-41)	24 (15-33)	0,84

**Tabela 11.** Concentração média das citocinas agrupando candidíase invasiva confirmada + provável em comparação com o grupo de candidíase invasiva afastada

Citocinas	Candidíase invasiva (provável + confirmada) (Amostras=130)	Candidíase invasiva afastada (Amostras =77)	Valor-p
IL-1 $\beta$	619 (178-1060)	1296 (720-1872)	0,07
TNF $\alpha$	528 (00-1365)	1281 (201-2360)	0,28
IFN $\gamma$	1477 (852-2103)	1540 (730-2350)	0,90
IL-6	201904	111879	0,10

	(136601-267207)	(26019-197739)	
IL-17A	1056 (429-1683)	990 (192-1788)	0,90
IL-4	447 (210-683)	682 (380-985)	0,23
IL-10	13542 (6987-20098)	6297 (00-14652)	0,18
PCR	26 (19-33)	24 (15-33)	0,67

Em relação ao desfecho dos pacientes, foi realizada análise multivariada para identificar fatores relacionados à mortalidade intra-hospitalar. Para essa análise, os valores de SOFA foram agrupados em 4 intervalos assim definidos: intervalo 1: SOFA  $\leq$  3; intervalo 2: SOFA entre 3 e 6; intervalo 3: SOFA entre 6 e 8; e intervalo 4: SOFA  $>$  8. Esse agrupamento de valores foi feito com a intenção de facilitar a visualização da associação entre valores encontrados de SOFA e o desfecho clínico observado. A distribuição dos valores de SOFA dentro dos intervalos descritos acima foi significativamente diferente entre os pacientes que faleceram e aqueles que sobreviveram ( $p=0,0037$ ). Além dos valores de SOFA, as concentrações de BDG ( $p=0,016$ ), IL-6 ( $p=0,016$ ), IL-17A ( $p=0,016$ ) e a relação IL6/IL10 ( $p=0,0039$ ) também apresentaram associação significativa com o desfecho. Nota-se que a idade, a positividade das culturas para *Candida*, o gênero, as citocinas IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN, TNF $\alpha$ , PCR, e a relação IL-10/TNF $\alpha$  não mostraram evidência de associação nessa análise, conforme evidenciado na tabela 12.

**Tabela 12.** Análise multivariada de fatores relacionados à óbito intra hospitalar

	Alta	Óbito	Valor-p
IL-1 $\beta$ (fg/mL)	545	1358	0,19
TNF $\alpha$ (fg/mL)	606	1427	0,26
IFN $\gamma$ (fg/mL)	1638	1439	0,39
IL-6 (fg/mL)	154996	192222	0,0164
IL-17A (fg/mL)	1167	1094	0,0164
IL-4 (fg/mL)	531	603	0,75
IL-10 (fg/mL)	6256	15591	0,76
Idade	51	60	0,38
Genero	F=38% / M=62%	F=37% / M=63%	0,42
BDG (pg/mL)	188	223	0,0165
SOFA*	1=40% 2=19% 3=32% 4=9%	1=26% 2=13% 3=29% 4=32%	0,0037
PCR (mg/L)	24	27	0,68
Cultura positiva fungo	Sim=44% Não=56%	Sim=52% Não=48%	0,79
Rel IL-6/IL-10	57	35	0,0039
Rel IL-10/TNF $\alpha$	16	131	0,40

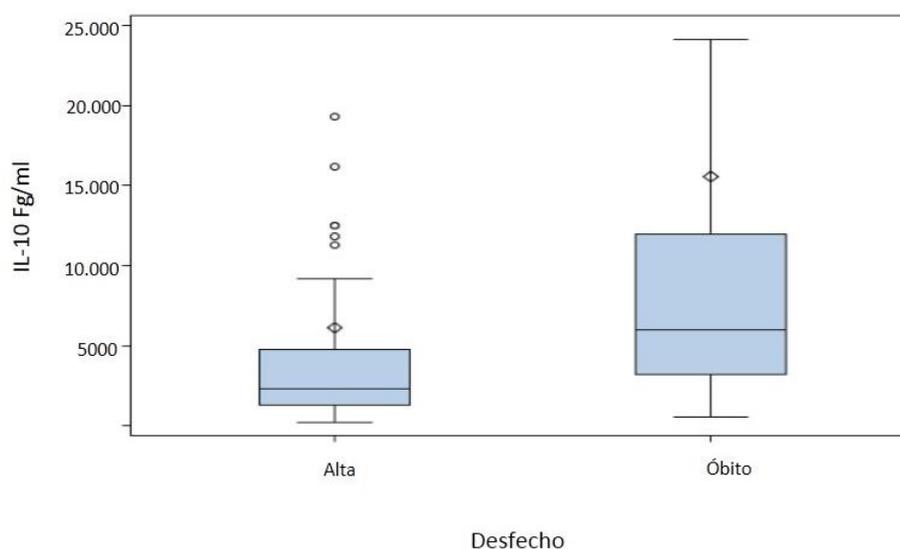
• (frequência de intervalos de valores do SOFA)

Para análise do desfecho, um ponto a ser considerado é a variação do escore de SOFA ao longo do tempo de estudo. Para avaliar essa variação, ajustou-se novo modelo para o desfecho, incluindo o efeito da interação do tempo com os valores de SOFA (análise de medida repetida do SOFA ao longo do tempo para cada paciente). A partir desse novo ajuste, os fatores que apresentaram associação com o desfecho foram a interação SOFA e Tempo ( $p=0,028$ ) (comportamento do SOFA ao longo do tempo para cada paciente individualmente) e IL-10 ( $p=0,03$ ).

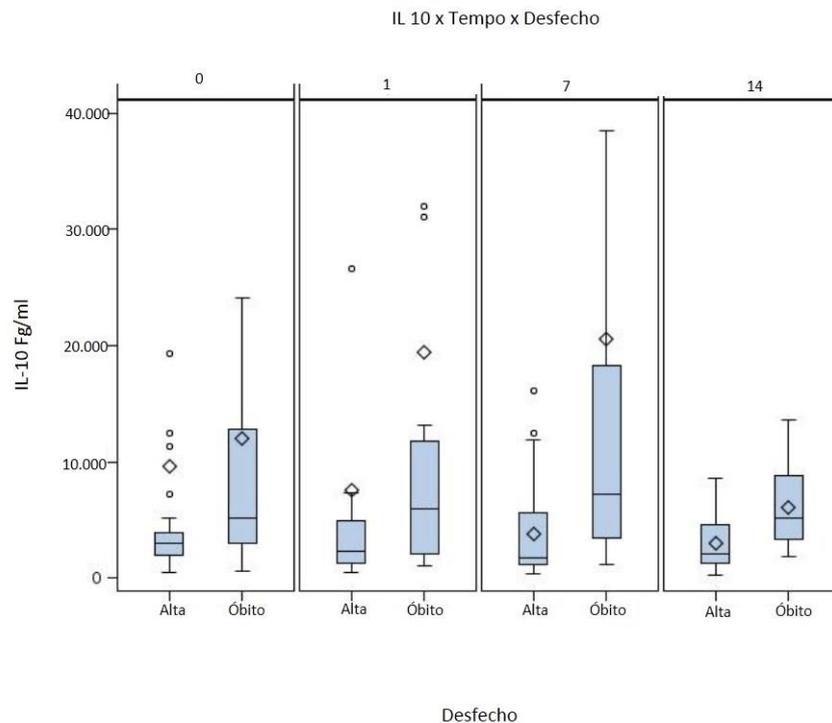
**Tabela 13.** Análise multivariada de fatores relacionados à óbito intra hospitalar levando em consideração a interação SOFA x Tempo para cada paciente individualmente

		D0	D1	D7	D14	Valor de P
Variação SOFA no tempo	Alta	6	5	4.0	3	0,0284
	Óbito	8	8	7	7	
IL10	Alta	9794	7676	3671	3114	0,0314
	Óbito	12052	19432	20619	6111	

O efeito da interação “SOFA x Tempo” pode ser observado pois, para os pacientes que vão à Obito, o SOFA é sempre maior e praticamente estável, ao passo que, para os pacientes que recebem alta, o SOFA é sempre menor e com tendência de queda.

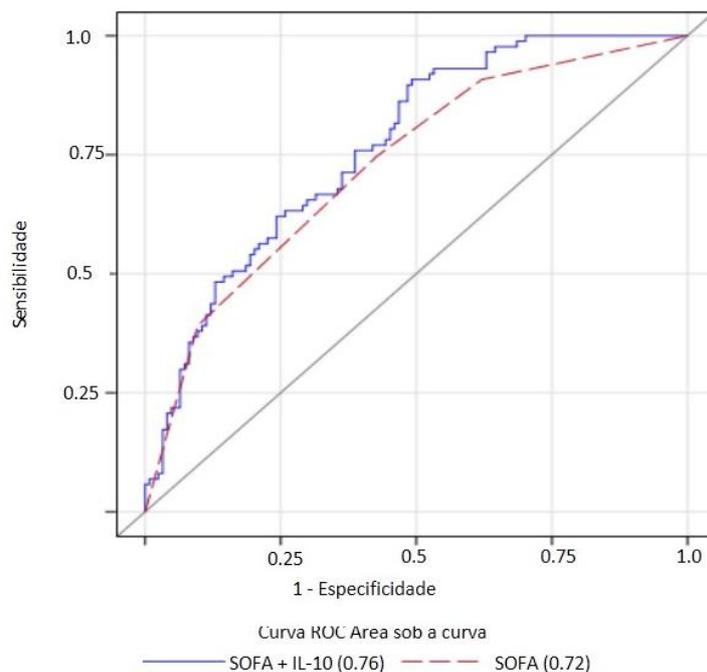


**Figura 7.** Distribuição das concentrações de IL-10 nos pacientes que receberam alta e evoluíram a óbito respectivamente



**Figura 8.** Distribuição das concentrações de IL10 nos pacientes que receberam alta e evoluíram a óbito nos diferentes momentos do estudo

Após identificados os principais fatores associados ao desfecho (SOFA e IL-10), foi construída uma curva ROC (figura 12) considerando no ajuste apenas o escore SOFA (modelo simples - linha vermelha) e considerando o escore SOFA + IL-10 (modelo completo - linha azul). A inclusão da IL-10 no ajuste aumenta a área sob a curva ROC de **0,73** para **0,77**, mostrando que avaliar o escore SOFA do paciente em conjunto com a interleucina IL-10 melhora discretamente a capacidade de prever o desfecho do paciente. A tabela 14 apresenta as razões de chance (odds ratio) de óbito em função dos valores do SOFA e da concentração de IL-10 ao longo do tempo.

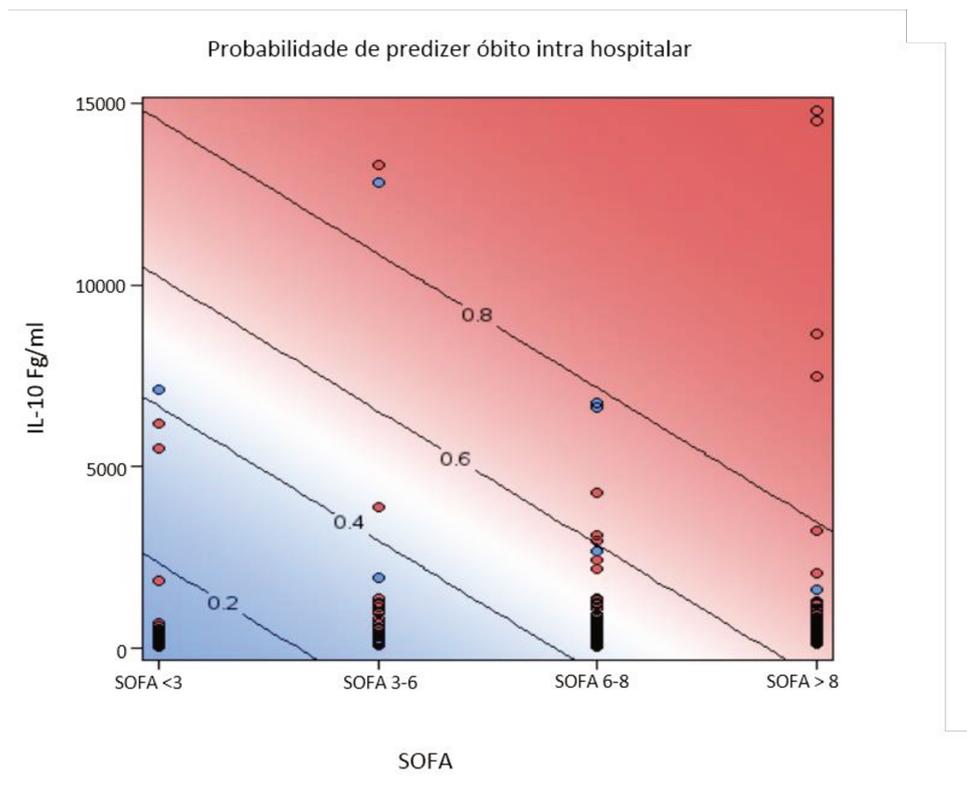


**Figura 9.** Curva ROC para prever mortalidade intra hospitalar

**Tabela 14:** Razões de chance (odds ratio) de óbito em função dos valores do SOFA e da concentração de IL-10 ao longo do tempo

Efeito	Razão de chance	Intervalo de Confiança
Aumento 1500fg/MI IL-10	1.4	1.048 - 1.862
SOFA >8 → SOFA >3	0.07	0.026 - 0.194
SOFA entre >8 → SOFA>3-6	0.2	0.079 - 0.532
SOFA entre >8 → SOFA 6-8	0.29	0.128 – 0.653

A figura 10 abaixo mostra que o risco de óbito do paciente é diretamente proporcional ao aumento do escore SOFA e do nível de IL-10. Quanto maior o escore SOFA (eixo X) e quanto maior o nível de IL-10 (eixo Y), maior o risco de óbito do paciente. Os pontos azuis e vermelhos neste gráfico representam os dados observados dos 59 pacientes analisados. Os pontos azuis são os pacientes que tiveram alta ao longo do tratamento e os pontos vermelhos são os pacientes que morreram ao longo do tratamento.



**Figura 10.** Faixas de probabilidade de evoluir a óbito em função score de SOFA e das concentrações de IL-10

## 5. DISCUSSÃO

### - 1,3 – $\beta$ -D- Glucan (BDG): Aspectos descritivos, limitações – uma ferramenta adjuvante para o diagnóstico da CI

Em nosso trabalho, dividimos os pacientes em três grupos, levando em consideração os resultados de BDG e as amostras clínicas de culturas para fungos do gênero *Candida*. Consideramos a BDG como positiva se as amostras de D0 e D1 fossem superiores a 80pg/mL. Conforme explicitado acima, o grupo de pacientes com BDG positiva e culturas para *Candida* negativas foi definido como composto por pacientes com CI provável. Pacientes com hemoculturas ou culturas de materiais normalmente estéreis obtidas por técnica asséptica e que apresentassem correlação com o quadro clínico dos pacientes com culturas positivas para *Candida* spp formaram o grupo de pacientes com CI provada, independentemente dos resultados do biomarcador. Pacientes com culturas negativas e BDG negativa formaram o grupo de pacientes com CI afastada. Essa proposta de classificação dos grupos de pacientes seguiu os mesmos princípios da utilizada pela EORTC (45). Ou seja, levamos em conta a presença de fatores de risco para desenvolvimento de CI (internação prolongada, uso prévio de ATB e uso de dispositivos invasivos), a presença de sinais clínicos compatíveis com quadros sépticos e a existência de um critério micológico (cultura ou BDG). A adoção de níveis séricos de BDG > 80pg/mL em dois dias consecutivos não foi originalmente proposta pelo EORTC como um critério micológico. Contudo, outros autores já propuseram que esse achado laboratorial fosse interpretado, dentro de um contexto clínico compatível, como uma evidência de infecção fúngica invasiva (17). Ressaltamos que parte da nossa casuística foi incluída no estudo após a comprovação da etiologia fúngica como agente causador do quadro séptico. Os níveis séricos de BDG coletados em D7 e D14 foram utilizados para analisarmos a cinética do biomarcador no cenário da assistência ao paciente crítico.

No que diz respeito às características gerais da população, uso prévio de antibióticos ou dispositivos invasivos, não houve diferença significativa entre os grupos, sendo eles, portanto, comparáveis.

Devido ao desenho de nosso trabalho, uma vez que foram incluídos pacientes com diagnóstico já estabelecido de CI e dado que definimos o grupo

de pacientes com duas medidas consecutivas de BDG > 80pg/mL como sendo de CI provável, não foi possível calcular sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos da BDG. Mohr e cols. encontraram sensibilidade de 100% e especificidade de 59% em pequena casuística formada por pacientes críticos de UTI cirúrgica (46). Posteraro e cols. utilizaram a BDG para diagnóstico de infecção fúngica invasiva em população de pacientes críticos e encontraram sensibilidade de 92,9%, especificidade de 93,7% com valor preditivo positivo de 72,7% e valor preditivo negativo de 98,7% (47). Nguyen e cols. descreveram sensibilidade de 56% e especificidade de 73% em casuística que incluiu pacientes com candidemia e CI (48). Tissot e cols. descreveram sensibilidade de 65%, especificidade de 78%, com valor preditivo positivo de 68% e valor preditivo negativo de 77%, utilizando o biomarcador para diagnóstico de candidíase intra-abdominal em pacientes críticos de UTIs cirúrgicas (49). Martin-Mazuelos e cols. encontraram sensibilidade de 80%, especificidade de 75%, valor preditivo positivo de 35% e valor preditivo negativo de 95% no uso da BDG para diagnóstico de CI em população de pacientes de UTI geral (50). Giacobe e cols., por sua vez, descreveram sensibilidade de 92%, especificidade de 81%, valor preditivo positivo de 79% e valor preditivo negativo de 93% em casuística de UTI utilizando a BDG em conjunto com a procalcitonina para diagnóstico de candidemia (51). Em nenhum desses trabalhos foram incluídos pacientes neutropênicos. A heterogeneidade desses resultados se explica pelos diferentes desenhos dos estudos. Em outras palavras, o desempenho do biomarcador muda em função da população estudada e da condição que se pretende diagnosticar (candidemia ou candidíase profunda, por exemplo).

Outra questão a ser discutida é que, de forma metodologicamente correta, nos trabalhos citados acima, o desempenho do biomarcador foi estabelecido tomando como referencial o método padrão-ouro para diagnóstico de candidemia/CI ou seja, o isolamento do fungo em culturas de materiais normalmente estéreis e obtidos por técnica asséptica. Contudo, conforme discutido anteriormente, os métodos baseados em culturas possuem limitações para diagnóstico de candidemia e CI na prática clínica diária e o objetivo do biomarcador não é o de substituir as culturas, mas sim o de identificar pacientes que se beneficiariam de terapia antifúngica a despeito de culturas negativas ou não finalizadas. Para que esse objetivo seja alcançado, é importante que se

conheça o comportamento do biomarcador em um cenário clínico real. Especificamente para a população de pacientes críticos e não neutropênicos, nosso trabalho objetivou caracterizar o comportamento do biomarcador quando utilizado para investigar um novo evento séptico e observar sua cinética.

Uma vez que não se observou mudanças nas concentrações de BDG ao longo do tempo em todos os grupos de pacientes, para fins de comparação entre as concentrações nos diferentes grupos, foi utilizada a média estimada de BDG calculada pelo modelo estatístico utilizado na análise do estudo. Em nossos resultados, pudemos observar que os níveis de BDG em pacientes sépticos com culturas positivas para *Candida* foram mais elevados. Na população de pacientes com culturas negativas para *Candida*, o uso do biomarcador e o valor de corte utilizado (80pg/mL) permitiram identificar dois subgrupos de pacientes (CI provável e afastada). As diferenças nas concentrações médias estimadas de BDG entre os grupos com CI comprovada e afastada (328pg/mL vs 47 pg/mL) e CI provável e afastada (245pg/mL vs 47 pg/mL) foram estatisticamente significantes ( $p < 0,001$  e  $0,005$ ). Entre os grupos com CI comprovada e provável, as concentrações médias foram diferentes, porém sem significância estatística ( $p=0,22$ ).

Em nosso estudo, por razões logísticas e de limitação de recursos, não realizamos culturas periódicas de colonização por *Candida*. Alguns autores identificaram títulos superiores a 80pg/mL em pacientes com colonização maciça por *Candida* spp (49,50). O grupo de pacientes com candidíase provável, é importante salientar, possuía quadro clínico compatível com sepse/choque séptico no momento de sua inclusão e a maioria destes pacientes não possuía culturas para agentes bacterianos que justificasse o quadro clínico. Contudo, não se pode afastar, por completo, a possibilidade de quadros bacterianos com culturas negativas em pacientes colonizados por *Candida* nesse grupo de pacientes. De toda forma, em um cenário de prática clínica real, esses pacientes provavelmente receberiam terapia para agentes fúngicos e bacterianos concomitantemente. Autores propõem a utilização de outros valores de cut-off e uso conjunto de outros testes como forma de diferenciar o paciente maciçamente colonizado daquele com indicação de terapia antifúngica em UTIs (mannana circulante e CAGTA) (52,53).

Interessante ressaltar que, em nossa população de estudo, não houve diferenças significativas de idade entre os três grupos de pacientes. Contudo, na análise multivariada realizada para avaliar fatores relacionados à presença de cultura positiva para *Candida* em amostras clínicas, além dos altos títulos de BDG, a idade apareceu associada à positividade das culturas. A mediana de idade dos pacientes com CI confirmada em nossa casuística (63 anos) foi superior à mediana de idade de outros grandes levantamentos epidemiológicos recentemente publicados (52,3 anos e 56 anos respectivamente), com a ressalva que esses levantamentos incluíram dados de populações pediátricas (54,55). A associação da idade com a positividade das culturas para *Candida* pode ser visualizada nas figuras 5 e 6. Com base nas características de nossa população, o modelo estatístico aplicado evidenciou que a probabilidade de se obter culturas positivas para *Candida* é diretamente proporcional aos títulos de BDG e à idade dos pacientes, o que pode ser evidenciado pelo aumento da AUC da curva ROC (de 0,76 para 0,86). Contudo, nossa casuística é pequena e não encontramos relatos de utilização dos níveis de BDG em associação com a idade para melhorar o desempenho do biomarcador. Esse achado reflete, portanto, uma característica da população do nosso estudo, influenciada pelo tamanho da amostra, o que não nos permite maiores conclusões acerca do uso combinado do biomarcador com dados demográficos.

Em relação às modalidades terapêuticas com potencial para causar resultados falso-positivos nos níveis de BDG, em nosso estudo, não houve diferença nas frequências de uso prévio à inclusão no estudo de hemoderivados, cirurgia abdominal, uso de combinações entre penicilinas e inibidores de beta lactamase e terapia de substituição renal, tal qual encontrado por Martín-Mazuelos e cols. e Tissot e cols. (49,50). Lo Cascio G e cols. identificaram, em trabalho retrospectivo envolvendo pacientes em UTIs, somente a utilização de albumina como um fator confundidor na interpretação dos níveis séricos de BDG (56). Apesar de relatos de falso positivos relacionados a uso de antibióticos (57,58), cirurgia (57), hemoderivados (60,61), hemodiálise (62), bem como a alta frequência de falsos positivos em estudo envolvendo pacientes onco-hematológicos (63), esse não parece ser um fator limitante para utilização do biomarcador em pacientes críticos. A proposta de se utilizar duas medidas consecutivas de BDG > 80pg/mL em dias subsequentes como critério de

positividade do biomarcador se justifica, exatamente para aumentar a especificidade e o valor preditivo positivo do teste, sem comprometimento da sensibilidade (17,49,50). O conhecimento sobre o potencial de falsos positivos é também importante no momento de decidir em quais populações o uso da BDG é factível, uma vez que testes positivos em populações com poucos fatores de risco e baixa prevalência para CI terão valores preditivos positivos muito baixos.

Em todos os grupos de pacientes, não houve alterações significativas das concentrações de BDG ao longo do tempo, independente do uso de terapia antifúngica e desfecho clínico observado, conforme evidenciado na tabela 6 e figura 2. É, contudo, importante ressaltar que realizamos medidas somente até o décimo quarto dia após a inclusão. A escolha por esse critério visou avaliar o comportamento do biomarcador no momento de suspensão da terapia antifúngica para a maioria dos pacientes tratados. O clearance do biomarcador é lento e a medida no décimo quarto dia não permite conclusões acerca do sucesso ou falência terapêutica, em concordância com os achados de outros autores (50,52,64). Tissot e cols. observaram queda nos níveis de BDG ao longo do tratamento. Contudo, ao final de 14 dias, os níveis ainda permaneciam acima de 80pg/mL nos pacientes com CI (49). Poissy J e cols. documentaram que, a despeito dos níveis de BDG permanecerem detectáveis por semanas após a positividade das hemoculturas, novos aumentos nas concentrações de BDG em pacientes com diagnóstico já estabelecido de candidemia apresentaram correlação com recorrência de culturas positivas para *Candida* (52). Jaijakul e cols., em análise retrospectiva de pacientes com CI, observaram que a queda dos níveis de BDG é relacionada a sucesso terapêutico e que um nível inicial de BDG < 416pg/mL é capaz de prever sucesso terapêutico com valor preditivo positivo de 89% (65). Ressaltamos que esse nível de 416pg/ml é significativamente superior ao cut-off de 80pg/ml. Com base em nossos dados e na literatura, podemos concluir que o biomarcador potencialmente possui relação com o resultado do tratamento. Contudo, a visualização dessa correlação envolve um longo tempo de monitorização e o ponto de corte de 80pg/mL provavelmente não é adequado para tal finalidade. Esses aspectos limitam a utilização da BDG como uma ferramenta prognóstica e para avaliar sucesso ou falência da terapia antifúngica na prática clínica diária.

Na análise de desfecho relacionada em nosso estudo, inicialmente observamos que houve correlação entre nível sérico de BDG e mortalidade. Essa observação ocorreu em todos os pacientes, independente da etiologia fúngica comprovada, provável ou afastada. Nessa análise levamos em conta, ainda, todos os valores do score de SOFA calculados nos dias zero, um, sete e 14, sem avaliar a variação individual desses valores para cada paciente individualmente. Ao levarmos em conta a evolução das disfunções orgânicas ao longo do tempo de estudo e correlacionarmos essa evolução com o desfecho, o papel prognóstico da BDG não foi novamente observado. Giacobbe e cols. relataram níveis de BDG > 287pg/ml como um fator de mal prognóstico em pacientes com CI (66). Nosso trabalho avaliou como desfecho a mortalidade intra-hospitalar. Envolveu pacientes com e sem CI em uma casuística de pacientes bastante heterogênea, sem nenhum tipo de intervenção terapêutica. Logo, as implicações prognósticas dos títulos de BDG encontradas em nosso trabalho devem ser interpretadas com bastante cautela e novos estudos são necessários para elucidar esta questão.

O uso do biomarcador como uma ferramenta para diagnóstico precoce de CI na UTI não pode ser avaliado em nosso trabalho em função das coletas terem sido efetuadas por ocasião da investigação de um novo quadro em pacientes já internados. A precocidade da positividade do biomarcador em relação às culturas pôde ser observada por outros autores no cenário da terapia intensiva (47,49,50,52). Para essa finalidade ser alcançada, deve-se realizar monitorização contínua dos níveis de BDG e não a coleta por ocasião da investigação de um novo quadro séptico, conforme definida no desenho de nosso trabalho.

Com base em nossos resultados, podemos confirmar que a BDG é uma ferramenta diagnóstica provavelmente útil para diagnóstico de candidíase invasiva na UTI. Além de comprovar a correlação entre cultura positiva para *Candida* e nível sérico de BDG, foi possível identificar um subgrupo de pacientes com fatores de risco para CI, com culturas negativas para *Candida*, e que potencialmente se beneficiaria de terapia antifúngica. Em nosso trabalho, não avaliamos se o tratamento indicado em função dos resultados de BDG foi benéfico para os pacientes. Em recente estudo prospectivo, randomizado e multicêntrico, o uso de micafungina empírica em pacientes críticos e colonizados

por *Candida* não resultou em maior sobrevida sem evidências de doença fúngica no vigésimo oitavo dia, mesmo para os pacientes com níveis de BDG > 80pg/mL (64). Contudo, é preciso observar que a população do presente estudo era formada por pacientes graves, com disfunção multiorgânica (Mediana de SOFA de 8). Em uma população com tais características, seria pouco provável que uma intervenção terapêutica específica e isolada resultasse em menor mortalidade. Apesar do resultado negativo em um *trial* multicêntrico, prospectivo e duplo-cego, não se pode afirmar que o início de terapia antifúngica baseado nos resultados de BDG não esteja indicada.

Uma série de outros trabalhos mostraram o potencial valor da BDG como uma estratégia para suspensão precoce de terapia antifúngica diante de dosagens séricas repetidamente negativas do biomarcador, mesmo em pacientes de alto risco para desenvolvimento de candidíase invasiva (67,68,69). Esse potencial benefício da BDG como ferramenta auxiliar para programas de racionalização de uso de antimicrobianos não foi avaliado em nosso trabalho e necessita ser confirmado em casuísticas maiores.

Os objetivos futuros das pesquisas nesta área poderiam ser apresentados da seguinte forma:

- Estabelecimento do real benefício da terapia antifúngica indicada por ocasião da positividade da BDG. Em outras palavras, o objetivo seria o de determinar o papel da terapia preemptiva para CI em pacientes críticos, não neutropênicos.
- Avaliação o uso da BDG como uma ferramenta para melhorar as estratégias de uso racional de antimicrobianos na terapia intensiva.

As respostas para estas questões dependeriam de *trials*, prospectivos, randomizados e multicêntricos. Idealmente, a população de pacientes críticos incluída nesses *trials* deveria ser subdividida de acordo com a presença de fatores de risco mais robustos para CI, diferenciando o impacto da terapia indicada pela positividade do biomarcador em uma população “geral” de pacientes críticos daquela observada em pacientes críticos com maior propensão a desenvolver CI (pós-operatório de cirurgia abdominal complicada, pancreatite necro-hemorrágica, etc). Idealmente, a monitorização dos títulos do biomarcador deveria ser feita de forma sistemática e rotineira, de forma a permitir o diagnóstico precoce da CI. O impacto do tratamento na sobrevida dos pacientes deveria ser analisado em conjunto com a gravidade das disfunções

orgânicas presentes nos mesmos. Além disso, tanto a incidência de CI das UTIs que incluíram pacientes quanto o consumo de antifúngicos nelas deveriam ser monitorizados, de forma a identificar benefícios secundários que poderiam resultar dessa estratégia de tratamento.

Como podemos ver, são tantas as variáveis e tantos as nuances a serem consideradas que dificilmente a medicina baseada em evidências conseguirá fornecer todas as respostas em médio prazo. Contudo, até que todas estas questões sejam respondidas, a monitorização da BDG em pacientes críticos e a conduta originada a partir desta monitorização poderão servir como ferramentas para particularizar a assistência prestada aos pacientes das UTIs. Um atendimento individualizado é desejável no paciente criticamente enfermo e o mesmo pode se beneficiar de estratégias diagnósticas e terapêuticas ainda não totalmente estabelecidas, desde que a interpretação dos resultados e a conduta sequencial sejam igualmente individualizadas. Para que isso ocorra, é necessário profundo conhecimento acerca do instrumental que se pretende utilizar. A construção deste conhecimento é a contribuição advinda do nosso trabalho.

#### **- Reposta Imune e CI**

No que diz respeito à avaliação da resposta imune através da mensuração de citocinas, em nosso trabalho não observamos variações significativas das concentrações de citocinas em fg/mL ao longo do tempo de estudo. Nosso trabalho também não conseguiu associar nenhuma citocina com a etiologia fúngica dos eventos sépticos estudados. Mesmo ao agrupar os pacientes com CI confirmada e provável e compará-los com o grupo de pacientes sem CI, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada no que diz respeito às concentrações de citocinas.

Na prática clínica diária, uma série de fatores clínicos e modalidades terapêuticas são associados à CI (cirurgia abdominal, fístula abdominal, uso de CVC, uso de NPP, uso prévio de antibióticos de largo espectro, hemodiálise, entre outros). Contudo, apenas a minoria dos pacientes expostos a essas condições desenvolve CI ao longo da internação hospitalar (70). Portanto, é possível que existam aspectos relacionados à resposta imune dos pacientes que, analisados em conjunto com os fatores de risco classicamente associados à CI, possam ajudar a compreender a gênese destes eventos. A mensuração de

citocinas permite avaliar fenotipicamente e simultaneamente diversos aspectos das respostas imunes inata e adaptativa. Portanto, poderia ser útil como uma avaliação exploratória inicial em uma população geneticamente heterogênea de pacientes críticos, em um cenário de “vida real”.

Em contraste com nossos achados, Akin et al, e Krause et al encontraram níveis significativamente mais elevados de IL-17A em pacientes com candidemia em comparação com pacientes com infecções bacterianas e controles saudáveis (71,72). A via de sinalização da IL-17 é especialmente importante no combate das infecções por fungos do gênero *Candida* ao nível das mucosas (27). Em modelos experimentais de infecção sistêmica por *Candida*, a importância da IL-17 foi demonstrada por autores como Saijo e cols e Huang e cols (73,74). Uma vez que a translocação a partir das mucosas é reconhecidamente importante na fisiopatologia dos episódios de CI, níveis elevados de IL-17A em pacientes com esta condição não são surpreendentes e refletem uma resposta imune “bem adaptada”, direcionada ao controle da infecção por esse agente. Contudo, em nossa casuística, não pudemos observar a presença de concentrações elevadas de IL-17A em pacientes com CI em comparação com pacientes com sepse por outras etiologias. Em nosso trabalho, não realizamos comparações com voluntários sadios. A impossibilidade de se relacionar as concentrações observadas de citocinas com o desenvolvimento de CI pode estar relacionada ao desenho do nosso estudo. Apenas a título de exemplo, Plantinga e cols. demonstraram a maior susceptibilidade à candidemia em pacientes portadores de três diferentes polimorfismos de nucleotídeo único no gene do *Toll-like receptor* do tipo 1. A produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 por monócitos estimulados de controles saudáveis portadores dos mesmos polimorfismos foi significativamente menor do que a observada em portadores dos haplótipos de alelos selvagens (75). Johnson e cols. avaliaram a associação de polimorfismos de nucleotídeo único em genes de seis diferentes citocinas – IL-12B, IFN $\gamma$ , IL-18, IL-10, IL1- $\beta$  e IL-8. Os polimorfismos de nucleotídeo únicos da IL-12B (rs41292470) e da IL-10 (rs1800896) estiveram associados ao desenvolvimento de candidemia refratária ao tratamento com terapia antifúngica. Esses polimorfismos estão associados a uma produção mais baixa de Interferon Gamma e mais alta de IL-10 (76). Van der Graaf e cols. identificaram que o polimorfismo de nucleotídeo único Asp299Gly no gene do *Toll-like receptor* tipo

4 estava associado a uma maior incidência de candidemia. Monócitos de voluntários sadios portadores deste polimorfismo produziram quantidades aumentadas de IL-10 (77). Polimorfismos de nucleotídeo único envolvidos com a modulação da produção de IL-6 também determinaram maior suscetibilidade ao desenvolvimento de candidemia em trabalho de Li e cols (78). Portanto, parece claro que existem aspectos imunes relacionados ao desenvolvimento de candidemia e CI, sendo alguns hospedeiros mais susceptíveis a infecções invasivas por fungos do gênero *Candida* em virtude de aspectos da resposta imune determinados geneticamente. A mensuração simultânea de várias citocinas no sangue, contudo, não foi efetiva em identificar qualquer fenótipo de resposta imune que pudesse ser explorado com maiores detalhes em estudos posteriores.

#### **- Implicações prognósticas da resposta imune na sepse prolongada**

Em relação ao desfecho dos pacientes, como era esperado, pudemos correlacionar mortalidade intra-hospitalar e o nível de disfunção orgânica, aferido através do score de SOFA. Em uma primeira análise multivariada de fatores relacionados ao óbito, além do score de SOFA, níveis mais elevados de IL-6 e valores mais baixos de IL-17A da relação IL6/IL10 apresentaram correlação com desfecho clínico desfavorável. Nesta análise, todos os valores de SOFA registrados ao longo do estudo (D0, 1, 7 e 14) foram incluídos, sem levar em conta a variação individual do score de SOFA ao longo do tempo.

Níveis elevados de uma citocina tida como “pró-inflamatória” (IL-6) apresentaram correlação com óbito. Simultaneamente, a evidência de uma resposta imune desbalanceada, com predomínio do componente “anti-inflamatório” em relação ao componente “inflamatório” (valores mais baixos da relação IL-6/IL-10) também apresentou correlação com maior mortalidade intra-hospitalar. Esses achados, em um primeiro momento, podem parecer incompatíveis caso queiramos atrelar o desfecho clínico observado a um padrão de resposta inflamatória dicotômico (“pró – inflamatória” x “anti-inflamatória”). O sistema imune busca promover a homeostase através da regulação da resposta imune, tentando promover atividade microbicida com o mínimo de dano tecidual ao hospedeiro. Respostas inflamatórias exacerbadas, como as que ocorrem em quadro sépticos, requerem respostas regulatórias igualmente vigorosas do sistema imune na tentativa de promover a homeostase. O aumento concomitante

de citocinas pró e anti-inflamatórias já foi documentado em trabalhos anteriores de outros autores, corroborando a ideia de que sistemas de regulação são ativados já no início da resposta imune (33, 79,). É importante ressaltar também que essas interações nos sistemas de pesos e contra-pesos da resposta imune ocorrem de forma dinâmica ao longo do tempo e a mensuração das citocinas nos fornece indícios dessa interação nos momentos em que são realizadas as coletas de sangue, contribuindo para a compreensão da fisiopatologia dos quadros sépticos, porém sem permitir classificar, de forma estanque, o padrão da resposta imune como “pró” ou “anti-inflamatória”.

Nesse sentido, propomos uma interpretação cuidadosa da associação entre óbito e a relação IL6/IL10, dentro de um contexto no qual níveis elevados de IL-6 também se correlacionaram com desfecho negativo. Desta forma, o achado inicial referente à relação IL-6/IL-10 elucida que também a alça de regulação anti-inflamatória participa e interfere no desfecho clínico dos doentes sépticos. Aparentemente, respostas exacerbadas nas duas direções (inflamatória e anti-inflamatória) podem ser associadas a desfecho clínico desfavorável e refletem a magnitude da disfunção imune promovida pelos quadros sépticos. É possível ainda interpretar a associação entre a relação IL-6/IL-10 e óbito como uma evidência de que a homeostase imunológica ainda não foi reestabelecida e a predominância da resposta anti-inflamatória em relação à magnitude da resposta inflamatória pode ser prejudicial para os pacientes. Frencken e cols. observaram correlação entre níveis elevados de IL-6 e IL10 em doentes sépticos e mortalidade tanto precoce quanto tardia. Seus dados, contudo, não conseguiram relacionar mortalidade precoce com níveis elevados de IL-6 e mortalidade tardia com níveis elevados de IL-10, colocando em xeque a hipótese de resposta imune dicotômica dos quadros sépticos. Nessa hipótese, ocorreria predomínio da resposta pró-inflamatória inicialmente e os óbitos precoces seriam decorrentes da “agressividade e descontrole” de tal resposta. Em uma fase mais tardia, haveria predomínio de resposta anti-inflamatória, que seria a responsável por óbitos tardios. A relação IL6/IL10 não foi preditora de óbito nesta casuística (80). Dimopoulou e cols., em casuística formada por pacientes críticos (infectados ou não), observaram relação entre concentrações de IL-6, IL8 e IL10 com disfunção orgânica e mortalidade em 28 dias (81). Landesberg e cols. correlacionaram óbito e disfunção orgânica com os níveis

séricos de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF $\alpha$  em pacientes sépticos (82). Em grande *trial* envolvendo 628 pacientes sépticos, concentrações mais elevadas de IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  medidos por ocasião do diagnóstico da sepse, foram associadas a maior mortalidade (83). Outros autores também documentaram correlação entre óbito e concentrações mais elevadas de citocinas pró e anti-inflamatórias simultaneamente (84,85). Em nossos resultados, nesta primeira análise multivariada de mortalidade, houve associação entre óbito e níveis inferiores de IL-17. Outros autores observaram associação entre as concentrações de IL-17 e o desenvolvimento de insuficiência renal e síndrome do desconforto respiratório agudo em quadros de sepse (86,87).

Após a observação de que os pacientes que faleciam apresentavam SOFA mais alto e estável ao longo do estudo, enquanto pacientes que sobreviviam apresentavam SOFA mais baixo e com tendência de queda ao longo do tempo, uma nova análise multivariada foi realizada, levando em consideração a variação individual do SOFA para cada paciente ao longo do tempo. Nessa nova análise, além dos valores de SOFA e seu comportamento ao longo do tempo, os níveis de IL-10 também foram preditores de maior mortalidade intra-hospitalar.

Relatos de diversos autores também associaram os níveis de IL-10 a uma maior mortalidade. Esses relatos incluíram pacientes sépticos com ou sem agente etiológico definido, em diferentes circunstâncias e envolviam desde pacientes admitidos na emergência até pacientes já hospitalizados no momento do diagnóstico da sepse (88,89,90,91). No entanto, em todos estes trabalhos as dosagens de IL-10 e de outros marcadores imunológicos foram realizadas tão logo se estabeleceu o diagnóstico de quadros sépticos. Nossa casuística de pacientes foi formada por pacientes com etiologia fúngica confirmada, provável ou afastada e nossos pacientes apresentavam, em sua maioria, uma evolução clínica sugestiva de “sepse prolongada” ou em vias de se estabelecer como tal, ou seja, mantinham quadro clínico compatível com sepse ou outros distúrbios inflamatórios há alguns dias, com alterações prévias na homeostase imunológica. Mesmo para uma população com estas características, a IL-10 apresentou associação com maior mortalidade intra-hospitalar, independentemente do agente etiológico envolvido. Riché e cols demonstraram evidências de concentrações persistentemente elevadas de marcadores de

resposta inflamatória, especialmente PD-1 e IL-7, um ano após a admissão hospitalar por choque séptico, corroborando a idéia de que a disfunção imune é prolongada (92). Portanto, o entendimento atual aponta os quadros sépticos como resultantes de uma disfunção imune marcada pela ativação simultânea de resposta pró e anti-inflamatórias e que são potencialmente duradouras. Nesse sentido, não é surpreendente constatar que marcadores de mau prognóstico de quadros sépticos aferidos na instalação do quadro clínico também possam ser associados a óbito em pacientes com “*protracted sepsis*”. Outros autores, conforme mencionado anteriormente, observaram outras evidências de imunossupressão em pacientes sépticos que evoluíram a óbito. Existe considerável controvérsia a respeito de as manifestações de imunossupressão serem marcadores de maior gravidade ou causa de maior mortalidade de pacientes sépticos (34,93).

Nossos dados, após consideração da variação individual do SOFA ao longo do tempo, apontaram associação de maior mortalidade com IL-10. Contudo, essas evidências devem ser analisadas em conjunto com as associações de óbito e IL-6, IL 17-A e a relação IL6/IL10. Nossa casuística é pequena, proveniente de um centro único e muito heterogênea no que diz respeito às causas de internação. Além disso, nossos pacientes não foram incluídos e estudados por ocasião das admissões hospitalares ou na UTI. Todas essas questões referentes às características de nossa população podem explicar as diferentes associações entre citocinas e óbito a depender da forma como se trabalha com os valores do SOFA. Contudo, esses dados permitem conclusões complementares e partilham de lógica biológica. Nossos dados não suportam a utilização de qualquer citocina como biomarcador para predição de desfecho em quadros sépticos, uma vez que as mesmas agregaram muito pouco ao score de SOFA, já largamente utilizado na prática clínica. Contudo, nossos dados contribuem para a compreensão da fisiopatologia dos quadros sépticos, inclusive para os pacientes com quadro de *protracted sepsis*, independente da etiologia fúngica.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados, portanto, permitem as seguintes conclusões:

- A BDG é um biomarcador útil na população de pacientes críticos. O ponto de corte de 80pg/mL permitiu a identificação de um subgrupo de pacientes que potencialmente se beneficiaria de terapia antifúngica. No entanto, o lento *clearance* do biomarcador limita sua utilização como uma ferramenta de avaliação da eficácia do tratamento antifúngico. As modalidades terapêuticas classicamente associadas como causadoras de resultados falso-positivos não parecem limitar a utilização da BDG em pacientes críticos e não neutropênicos. A influência da colonização maciça nos títulos do biomarcador não foi avaliada em nosso trabalho.

- Em relação à resposta imune, a mensuração simultânea de diversas citocinas não permitiu identificar aspectos imunológicos relacionados à gênese ou ao desfecho da CI a serem explorados em outros trabalhos futuros.

- No que diz respeito ao desfecho dos quadros sépticos, pudemos observar que tanto citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias possuem potencial impacto no prognóstico dos pacientes com sepse prolongada (*protracted sepsis*), independente dos agentes etiológicos envolvidos. Dentro de um contexto de grande disfunção imune, a magnitude da resposta “anti-inflamatória”, aferida principalmente pelas concentrações da IL-10, esteve associada a maior mortalidade intra-hospitalar.

- Nossos resultados não sustentam a utilização da IL-10 como um biomarcador para definir desfecho de pacientes críticos a ser incorporado na prática clínica, uma vez que sua utilização em conjunto com score de SOFA agregou muito pouco em relação à capacidade de predizer óbito do score quando utilizado isoladamente. Contudo, esse achado contribuiu para a compreensão fisiopatológica dos desfechos observados nos quadros sépticos.

- Resta elucidar se a IL-10, bem como uma série de outras manifestações de exaustão da resposta imune são marcadores de gravidade dos quadros sépticos ou causas, *per se*, de maior mortalidade.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2016;62(4):e1–50
- 2) Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, et al. Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* 2014, 40(9):1303-1312.
- 3) Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, et al. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med* 2014, 40(6):839-845.
- 4) Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, et al. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005, 24(11):721-726.
- 5) Fagnani R, Resende MR, Trabasso P, et al. Mortality related to candidemia and risk factors associated with non-*Candida albicans*. *Infect Dis (Lond)* 2015, 47(12):930-931.
- 6) Al-Dorzi HM, Sakkijha H, Khan R, et al. Invasive candidiasis in critically ill patients: A prospective Cohort Study in Two Tertiary Care Centers. *J Intensive Care Med*. 2018 Jan
- 7) Zaoutis TE, Argon J, Chu J, et al. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1232–1239 11.
- 8) Garey KW, Rege M, Pai MP, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis*. 2006 Jul 1;43(1):25-31
- 9) Clancy CJ, Nguyen MH: Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013, 56(9):1284-1292.
- 10) Thorn JL, Gilchrist KB, Sobonya RE, et al. Postmortem candidaemia: marker of disseminated disease. *J Clin Pathol* 2010; 63:337–40.
- 11) Kami M, Machida U, Okuzumi K, et al. Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy. *Br J Haematol* 2002; 117:40–6.
- 12) Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:3640–3645 13.

- 13) Pittet D, Monod M, Suter PM, et al. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; 220:751–758
- 14) Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al: A bedside scoring system. (“Candida score”) for early antifungal treatment in non-neutropenic critically ill patients with Candida colonization. *Crit Care Med* 2006; 34:730 –737
- 15) Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. Usefulness of the “Candida score” for discriminating between Candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients:a prospective multicenter study. *Critical Care Med* 2009; 37:1624–1633
- 16) Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:271–6.
- 17) Ostrosky-Zeichner L, Shoham S, Vazquez J, et al. MSG-01: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial of caspofungin prophylaxis followed by preemptive therapy for invasive candidiasis in highrisk adults in the critical care setting. *Clin Infect Dis* 2014; 58:1219–1226
- 18) Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1→3)-β-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; 345:17–20.
- 19) Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. b-d-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39:199–205.
- 20) Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the 1-3 beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41(5):654-9
- 21) Shabaan AE, Elbaz LM, El-Emshaty VM, et al. Role of serum 1,3β-d-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr (Rio J)*. 2017 Nov 13. pii: S0021-7557(17)30358-3
- 22) Passos AIM, Dertkigil RP, Ramos MC, et al. Serum markers as na aid in the diagnosis of pulmonar fungal infections in AIDS patients. *Braz J Infect Dis*. 2017 Nov - Dec;21(6):606-612.
- 23) Levesque E, Rizk F, Noorah Z, et al. Detection of (1,3)-β-d-Glucan for the diagnosis of invasive fungal infection in liver transplant recipients. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 19;18(4).
- 24) Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, et al: ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18 Suppl 7:9-18.

- 25) Bassetti M, Garnacho-Montero J, Calandra T, et al. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2017 Sep;43(9):1225-1238.
- 26) Richardson PJ, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infections. *Virulence* 2015, May-Jun; 6(4): 327–337.
- 27) Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW et al. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2015 Oct;15(10):630-42
- 28) Salomao R, Brunialti MK, Rapozo MM, et al. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock.* 2012 Aug;38(3):227-42
- 29) Wang X, van de Veerdonk FL, Netea MG. Basic genetics and immunology of *Candida* infections. *Infectious disease clinics of North America.* 2016 Mar 30(1):85-102
- 30) Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med.* 2009 Oct 29;361(18):1727-35.
- 31) Drewniak A, Gazendam RP, Tool AT et al. Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD 9 deficiency. *Blood.* 2013 Mar 28;121(13):2385-92.
- 32) Gow NA, van der Veerdonk FL, Brown AJ et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Dec 12;10(2):112-22
- 33) Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock. *Lancet* 2018 Jul; 392 (10141):75-87
- 34) Mira JC, Gentile LF, Mathias BJ, et al. Sepsis pathophysiology, chronic critical illness and persistent inflammation-immune suppression and catabolism syndrome. *Critical Care Medicine* 2017 45(2):253-62
- 35) Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *Journal Acute Care Surg* 2012;72:1491-1501h
- 36) Monneret G, Finck ME, Venet F, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004, 95(2):193-198
- 37) Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011, 306(23):2594-2605.
- 38) Gomez HG, Gonzalez SM, Londoño JM, et al: Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: A longitudinal study. *Crit Care Med* 2014; 42:771–780

- 39) van Vught LA, Klein Klouwenberg PM, Spitoni C, et al. Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA*. 2016 Apr 12;315(14):1469-79
- 40) Peronnet E, Venet F, Maucort-Boulch, et al. Association between mRNA expression of CD 74 and IL10 and risk of ICU acquired infections: a multicenter cohort study. *Intensive Care Medicine* 2017 Jul;43(7):1013-1020.
- 41) Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003, 29(4):530-538.
- 42) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016, 315(8):801-810.
- 43) McCullagh P, Nelder, J.A.: *Generalized linear models*, 1st. edn. London: Chapman and Hall; 1983.
- 44) Nelder JA, Wedderburn, R.W.M.: *Generalized linear models*. *J R Stat Soc A* 135
- 45) De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1813–21.
- 46) Mohr JF, Sims C, Paetznick V, et al. Prospective survey of (1-3)-Beta D Glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care setting. *J. clin microbial* 2011;49(1): 58-61
- 47) Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, et al. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1-3)  $\beta$ -D glucan assay, *Candida* score and colonization index. *Crit care* 2011;15(5):R249
- 48) Nguyen HM, Wissel MC, Shields RK, et al. Performance of candida real time polymerase chain reaction,  $\beta$ -D glucan assay and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect dis* 2012;54(9):1240-8
- 49) Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, et al.  $\beta$  glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(9):1100-9
- 50) Martín-Mazuelos E, Loza A, Castro C, et al. B-D- Glucan and *Candida albicans* germ tube antibody in ICU patients with invasive candidiasis. *Intensive Care Med* 2015;41(8):1424-32

- 51) Giacobe DR, Mikulska M, Tumbarello M, et al. Combined use of serum (1-3)-Beta D Glucan and procalcitonin for the early differential diagnosis between Candidaemia and bacteraemia in intensive care units. *Crit care* 2017; 21(1):176
- 52) Poissy J, Sendid B, Damiens S, et al. Presence of cell wall derived polysaccharides in the sera of intensive care patients:relation with candidaemia and candida colonization. *Crit Care* 2014;29(3):R135
- 53) Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. Value of  $\beta$ -D-Glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med* 2012;38(8):1315-25
- 54) Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH Alliance®)registry,2004-2008. *Diagn microbial infect dis* 2012;74(4):323-31
- 55) Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB,et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance program. *Plos One* 2016;25(11):e0146909
- 56) Lo Cascio G, Koncan R, Stringari G, et al. Interference of confounding factors on the use of (1,3)-beta-d-glucan in the diagnosis of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Feb;34(2):357-65.
- 57) Mennink-Kersten MA, Warris A, Verweii PE. 1,3-beta –D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med* 2006;354(26):2834-5
- 58) Ito S, Ashizawa M, Sasaki R,et al. False positive administration of 1,3-beta-D-glucan caused by continous administration of penicillin G. *J infect chemoter* 2018;(18)
- 59) Prattes J, Hoenigl M, Rabensteiner J,et al. Serum 1-3-beta-d-glucan for antifungal treatment stratification at the intensive care unit and the influence of surgery. *Mycoses* 2014;57(11):679-86
- 60) Liss B, Cornely OA, Hoffmann D. 1,3- $\beta$ -D-glucan concentrations in blood products predict false positive post-transfusions results. *Mycoses*. 2016 Jan;59(1):39-42
- 61) Hammarström H, Kondori N, Friman V. How to interpret sérum levels of beta glucan for the diagnosis of invasive fungal infections in adult high risk hematology patients: optimal cut-off levels and confounding factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 May;34(5):917-25.
- 62) Prattes J, Schilcher G, Krause R. Realiability of serum 1,3-beta-D-glucan assai in patients undergoing renal replacement therapy: a review of the literature.*Mycoses* 2015;58(1):4-9
- 63) Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M. Difficulties in using 1,3- $\beta$ -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients

with haematological malignancies – high frequency of false positive results and their analysis. *J Med Microbiol.* 2010 Sep;59(Pt 9):1016-22

64) Timsit JF, Azoulay E, Schwebel C, et al. : Empirical Micafungin Treatment and Survival Without Invasive Fungal Infection in Adults With ICU-Acquired Sepsis, *Candida* Colonization, and Multiple Organ Failure: The EMPIRICUS Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016, 316(15):1555-1564.

65) Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L: (1,3)-beta-D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2012, 55(4):521-526

66) Giacobbe DR, Esteves P, Bruzzi P, et al. Initial serum (1,3)- $\beta$ -Dglucan as a predictor of mortality in proven candidaemia: findings from a retrospective study in two teaching hospitals in Italy and Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Oct;21(10):954.e9-17

67) Posteraro B, Tumbarello M, De Pascale G, et al. (1,3)- $\beta$ -d-glucan-based antifungal treatment in critically ill adults at high risk of candidaemia: an observational study. *J Antimicrob Chemoter* 2016;71:2262-9

68) Nucci M, Nouér SA, Esteves P, et al. Discontinuation of empirical antifungal therapy in ICU patients using 1,3- $\beta$ -d-glucan. *J Antimicrob Chemoter* 2016;71:2628–2633

69) Rouzé A, Loidant S, Poissy J, et al. Biomarker-based strategy for early discontinuation of empirical antifungal treatment in critically ill patients: a randomized controlled trial. *Intensive care med* 2017;43:1668-1677

70) Kullberg BJ, Arendrup MC: Invasive Candidiasis. *N Engl J Med* 2015, 373(15):1445-1456.

71) Akin H, Akalin H, Budak F, et al. Alterations of serum cytokine levels and their relation with inflammatory markers in candidemia. *Med Mycol.* 2015 Apr;53(3):258-68

72) Krause R, Zollner-Schwetz I, Salzer HJ, et al: Elevated levels of interleukin 17A and kynurenine in candidemic patients, compared with levels in noncandidemic patients in the intensive care unit and those in healthy controls. *J Infect Dis* 2015, 211(3):445-451.

73) Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):681-91.

74) Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin 17A for systemic anti *Candida albicans* host defense in mice. *The Journal of infectious disease* 2004;190:624-31.

75) Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, et al. Toll- like receptor 1 polymorphisms increase Susceptibility to Candidemia. *The journal of Infectious diseases* 2012; 205:934-43.

- 76) Johnson MD, Plantinga TS, van de Vosse E, et al. Cytokine gene polymorphisms and the outcome of invasive candidiasis: a prospective cohort Study. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 54(4):502-10.
- 77) Van der Graaf CAA, Netea MG, Morré SA, et al. Toll like receptor 4 Asp299/Th399 polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw*. 2006 Mar;17(1):29-34.
- 78) Li Y, Oosting M, deelen P, et al. Inter-individual variability and genetic influences on cytokine response on bacteria and fungi. *Nature Medicine* 2016 Aug;22(8):952-960.
- 79) Tamayo E, Fernández A, Almansa R, et al: Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur Cytokine Netw* 2011; 22:82–87
- 80) Frencken JF, van Vught LA, Peelen LM, et al. An unbalanced inflammatory response is not associated with mortality following sepsis: A prospective cohort study. *Crit Care Med*. 2017 May;45(5):e493-e499
- 81) Dimopoulou I, Orfanos S, Kotanidou A, et al. Plasma pro- and anti-inflammatory cytokine levels and outcome prediction in unselected critically ill patients. *Cytokine* 2008, 41(3):263-267.
- 82) Landesberg G, Levin PD, Gilon D, et al. Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: No Correlation With Inflammatory Cytokines in Real-life Clinical Setting. *Chest* 2015, 148(1):93-102.
- 83) Kellum JA, Pike F, Yealy DM, et al. Relationship between alternative resuscitation strategies, host response and injury biomarkers, and outcome in septic shock: Analysis of the ProCESS study. *Crit Care Med*. 2017 March ; 45(3): 438–445.
- 84) Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, et al: A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine* 2012; 57:332–336
- 85) Suarez-Santamaria M, Santolaria F, Perez-Ramirez A, et al. Prognostic value of inflammatory markers (notably cytokines and procalcitonin), nutritional assessment, and organ function in patients with sepsis. *Eur Cytokine Netw* 2010, 21(1):19-26
- 86) Mikacenic C, Hansen EE, Radella F, et al. Interleukin-17A Is Associated With Alveolar Inflammation and Poor Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med*. 2016 Mar;44(3):496-502
- 87) Maravitsa P, Adamopoulou M, Pistiki A, et al. Systemic over-release of interleukin-17 in acute kidney injury after septic shock: Clinical and experimental evidence. *Immunol Lett*. 2016 Oct;178:68-76

- 88) Chuang TY, Chang HT, Chung KP, et al. High levels of serum macrophage migration inhibitory factor and interleukin 10 are associated with a rapidly fatal outcome in patients with severe sepsis. *Int J Infect Dis.* 2014 Mar;20:13-7
- 89) Minejima E, Bensman J, She RC, et al. A dysregulated balance of proinflammatory and Anti-inflammatory host cytokine response early during therapy predicts persistence and mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Crit Care Med.* 2016 Apr;44(4):671-9
- 90) Rose WE, Eickhoff JC, Shukla SK, et al. Elevated serum Interleukin-10 at time of hospital admission is predictive of mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *The Journal of Infectious diseases.* 2012; 206: 1604-11.
- 91) Li X, Xu Z, Pang X, Huang Y, et al. Interleukin10/lymphocyte ratio predicts mortality in severe septic patients. *PLoS One.* 2017 Jun 19;12(6):e0179050.
- 92) Riche F, Chousterman BG, Valleur P, et al. Protracted immune disorders at one year after ICU discharge in patients with septic shock. *Critical Care* 2018 Feb;22(1):42
- 93) Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, et al. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Jun 30;2:16045.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1 – Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 18/02/11  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 003/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
**CAAE:** 1039.0.146.000-11

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “RESPOSTA INFLAMATÓRIA TH1, TH2, TH17 EM PACIENTES COM SEPSE POR CANDIDA SP EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA”.

**PEQUISADOR RESPONSÁVEL:** Luis Felipe Bachur

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 05/01/2010

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 18/02/12 (O formulário encontra-se no site acima).

#### II - OBJETIVOS

Contribuir para a compreensão das interações entre os diferentes tipos de resposta imune adaptativa no contexto das infecções invasivas por Cândida, agente oportunista prevalente em ambiente de UTI.

#### III - SUMÁRIO

Serão avaliados cerca de 60 pacientes internados em unidades de terapia intensiva do HC-Unicamp e do Hospital São Paulo da UNIFESP. Será calculado o escore APACHE II, score SOFA. Será colhido hemocultura de sítios venosos e do cateter venoso central. Será colhida uma amostra de sangue para dosagem de beta glucana, PCR para Cândida, dosagem de IL6, TNF alfa, IL10 e IL17.

#### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

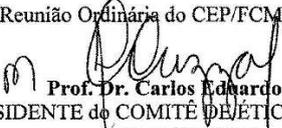
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de janeiro de 2011.

  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

## Anexo 2 – Aprovação do relatório parcial do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP



CEP, 23/06/15.  
(PARECER CEP: N° 003/2011)

Universidade Estadual de Campinas  
Pró-Reitoria de Pesquisa  
Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER

#### I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “RESPOSTA INFLAMATÓRIA TH1, TH2, TH17 EM PACIENTES COM SEPSE POR CANDIDA SP EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luis Felipe Bachur

#### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou o Relatório Parcial, apresentado em fevereiro de 2015, do protocolo de pesquisa supracitado.

#### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 23 de junho de 2015.

  
Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini  
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
UNICAMP

## Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Termo de Consentimento Informado e Esclarecido "Resposta Inflamatória Th1, Th2, Th17 em pacientes com sepse por *Candida sp* internados em Unidades de terapia intensiva"

Os pacientes internados em unidades de terapia Intensiva ficam sujeitos a uma série de complicações clínicas. Dentre estas complicações, destacamos a sepse por *Candida sp*. Trata-se de uma infecção que acomete pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Esta infecção é causada por fungos do Gênero *Candida*. Estes fungos normalmente habitam o organismo de seres humanos saudáveis sem causar nenhuma doença. Os pacientes que recebem antibióticos e permanecem internados na UTI por períodos mais longos ficam enfraquecidos e podem desenvolver infecção por *Candida*. Ou seja, aquele fungo que inicialmente não representava nenhum risco para os seres humanos pode vir a causar doença nos pacientes debilitados, internados na UTI.

Estamos iniciando um estudo de avaliação do funcionamento do sistema imunológico em pacientes com infecção suspeita ou confirmada por fungos do gênero *Candida*. O sistema imunológico é o "exército" responsável pela defesa do nosso organismo contra os agentes causadores de doença.

Fica esclarecido que haverá necessidade de coleta de sangue para a realização do presente estudo. Contudo, a conduta médica a ser adotada não sofrerá nenhuma alteração. Em outras palavras, trata-se de um estudo descritivo. Os pacientes incluídos no estudo serão tratados de forma idêntica àqueles não incluídos. Não serão realizados tratamentos experimentais de qualquer ordem.

Fica esclarecido também que a não participação no presente estudo não acarretará nenhum prejuízo para o tratamento do paciente. A inclusão do paciente somente será feita mediante aceitação por parte do próprio paciente ou de seus familiares. A participação no estudo pode ser suspensa a qualquer momento, se esta for a vontade do paciente ou de seus familiares.

Frente a qualquer questão ou dúvida, poderei entrar em contato com o médico Luís Felipe Bachur, na Comissão de Controle de Infecção Hospitalar no período das 8h00 até às 17h00 nos dias úteis, ou através do telefone (19)3521-7054.

Se você tiver alguma reclamação ou denúncia de aspecto ético referente à pesquisa, contate o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP no número (19)3521.8936.

Afirmo que compreendi e estou ciente do que foi explicado acima.

Pretendo colaborar com o estudo, e para tanto estarei respondendo ao questionário oferecido.

Assim informado, estou de acordo em participar desse estudo e subscrevo-me.

Nome \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante Data

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Dr. Luís Felipe Bachur Data  
(Pesquisador Responsável)

## Anexo 4 – Ficha de Coleta de Dados Clínicos

### Ficha de Seguimento Clínico:

Resposta Inflamatória Th1, Th2 e Th17 em pacientes com sepse por *Candida* SP internados em Unidade de Terapia Intensiva

Nome: \_\_\_\_\_

HC: \_\_\_\_\_ Gênero: M  F  Idade: \_\_\_\_\_

Data de Inclusão no estudo: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data de Admissão UTI: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Diagnóstico de Admissão UTI: \_\_\_\_\_

#### Comorbidades

- Diabetes Mellitus  Doença Cardio Vascular  
 Doença Renal Crônica  Cirrose Hepática  
 Neoplasia  Pneumopatia Crônica

#### Uso de Antibióticos

	Sim	Não	Data de Início
Penicilina + Inibidores	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Carbapenêmicos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Cefalosporinas de 3ª e 4ª geração	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Polimixina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Glicopeptídeos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Outros: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____

#### Momentos de Interesse

	Sim	Não	Data de Início
Cateter venoso central	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Nutrição parenteral total	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Nutrição Enteral	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Hemodiálise	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Cirurgia abdominal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Pancreatite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Catéter Vesical	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Ventilação Mecânica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____
Outra Cirurgia _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	____/____/____

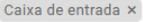


**Uso de Antibióticos**

<b>Data de Início</b>	<b>Data de Término</b>	<b>Observação</b>
__/__/__	__/__/__	
__/__/__	__/__/__	
__/__/__	__/__/__	
__/__/__	__/__/__	
__/__/__	__/__/__	
__/__/__	__/__/__	
__/__/__	__/__/__	
__/__/__	__/__/__	

**Desfecho Clínico****Situação do Paciente****48 horas:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_**72 horas:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_**07 Dias:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_**14 Dias:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Anexo 5 – Submissão do artigo para publicação

Notification to co-authors of submission to **BMC Infectious Diseases** INFD-D-18-00766 



**BMC Infectious Diseases Editorial Office** <em@editorialmanager.com>  
para eu ▾

sáb, 28 de abr de 2018 15:04 ☆ ↶ ⋮

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês ×

INFD-D-18-00766

Clinical and inflammatory parameters and hospital mortality of patients with sepsis and invasive candidiasis

Luís Felipe Bachur, M.D.; Reinaldo Salomão; Mariangela Ribeiro Resende; Plínio Trabasso; Cibele Aparecida Tararam; Ariane Fidelis Busso-Lopes; Milena Karina Coló Brunialti; maria luiza moretti, MD

Dear author:

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to **BMC Infectious Diseases**. The manuscript details are below.

Title: Clinical and inflammatory parameters and hospital mortality of patients with sepsis and invasive candidiasis

Authors: Luís Felipe Bachur, M.D.; Reinaldo Salomão; Mariangela Ribeiro Resende; Plínio Trabasso; Cibele Aparecida Tararam; Ariane Fidelis Busso-Lopes; Milena Karina Coló Brunialti; maria luiza moretti, MD

Corresponding author: Dr maria luiza moretti

If you are not aware of the submission, or if you should not be listed as contributing author, please notify the Editorial Office. Contact details for the Editorial Office are available under "Contact Us" on the journal website.

