



ARTIGO ORIGINAL

# Role of serum (1,3)- $\beta$ -D-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit<sup>☆</sup>



Abd Elazeez Shabaan<sup>a,\*</sup>, Lobna Mahmoud Elbaz<sup>b</sup>, Wafaa M. El-Emshaty<sup>c</sup> e Basma Shouman<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Mansoura University, Department of Pediatrics, Almançora, Egito

<sup>b</sup> Mansoura General Hospital, Department of Pediatrics, Almançora, Egito

<sup>c</sup> Mansoura University, Department of Clinical Pathology, Almançora, Egito

Recebido em 18 de abril de 2017; aceito em 18 de julho de 2017

## KEYWORDS

(1,3)- $\beta$ -D-glucan;  
Invasive candidiasis;  
Neonatal sepsis

## Abstract

**Objectives:** To study the microbiological pattern of late onset neonatal sepsis cultures and to assess the diagnostic performance of serum (1,3)- $\beta$ -D-glucan level for early diagnosis of invasive fungemia in high-risk infants admitted to a neonatal intensive care unit.

**Methods:** A prospective multicenter clinical trial conducted on infants at high risk for invasive fungal infections, with suspected late onset sepsis, admitted to a neonatal intensive care unit at Mansoura University Children's Hospital and Mansoura General Hospital between March 2014 and February 2016.

**Results:** A total of 77 newborn infants with high risk of invasive fungal infection were classified based on blood culture into three groups: no fungemia (41 neonates with proven bacterial sepsis), suspected fungemia (25 neonates with negative blood culture), and definite fungemia group (11 neonates with culture-proven *Candida*). The growing organisms were *Klebsiella* spp. (14/54); *Escherichia coli* (12/54); *Staphylococcus* spp. (12/54; coagulase-negative *Staphylococcus* [9/54]; *Staphylococcus aureus* [3/54]); *Pseudomonas aeruginosa* (3/54); and *Proteus* spp. (2/54). Moreover, 11/54 presented *Candida*. Serum (1,3)- $\beta$ -D-glucan concentration was significantly lower in the no fungemia group when compared with the definite fungemia group. The best cut-off value of (1,3)- $\beta$ -D-glucan was 99 pg/mL with sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and accuracy of 63.6%, 95.1%, 77.8%, 90.7%, and 88.5%, respectively.

DOI se refere ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.07.020>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Shabaan AE, Elbaz LM, El-Emshaty WM, Shouman B. Role of serum (1,3)- $\beta$ -D-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. J Pediatr (Rio J). 2018;94:559–65.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [ashabaan1973@gmail.com](mailto:ashabaan1973@gmail.com) (A.E. Shabaan).

**PALAVRAS-CHAVE**

(1,3)- $\beta$ -D-glucano;  
Candidíase invasiva;  
Sepse neonatal

**Conclusion:** (1,3)- $\beta$ -D-glucan assay has a limited sensitivity with excellent specificity and negative predictive value, which allow its use as an aid in exclusion of invasive neonatal fungal infection. Accurate diagnosis and therapeutic decisions should be based on combining (1,3)- $\beta$ -D-glucan assay with other clinical, radiological, and microbiological findings.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### O papel do (1,3)- $\beta$ -D-glucano no soro no diagnóstico precoce de infecções fúngicas invasivas em uma unidade de terapia intensiva neonatal

**Resumo**

**Objetivos:** Estudar o padrão microbiológico das culturas de sepse neonatal de início tardio e avaliar o desempenho diagnóstico do nível de (1,3)- $\beta$ -D-glucano no soro para diagnóstico precoce de fungemia invasiva em neonatos de alto risco internados em uma unidade de terapia intensiva neonatal.

**Métodos:** Ensaio clínico multicêntrico prospectivo conduzido em neonatos internados em uma unidade de terapia intensiva neonatal com suspeita de sepse de início tardio que estavam em risco de infecções fúngicas invasivas no hospital universitário infantil de Almançora e no hospital geral de Almançora entre março de 2014 e fevereiro de 2016.

**Resultados:** Foram classificados 77 neonatos recém-nascidos com risco de infecção fúngica invasiva, com base na hemocultura, em: grupo sem fungemia, incluindo 41 neonatos com sepse bacteriana comprovada, grupo com suspeita de fungemia, incluindo 25 neonatos com hemocultura negativa; e grupo com fungemia definida, incluiu 11 neonatos com *Candida* comprovada por cultura. Os organismos em crescimento foram: {*Klebsiella* spp 14/54; *E. coli* 12/54; *Staphylococcus* spp 12/54 (*Staph* coagulase negativa 9/54; *Staph aureus* 3/54); *pseudomonous aeruginosa* 3/54 e *Proteus* spp 2/54}, além de 11/54 *Candida*. A concentração de (1,3)- $\beta$ -D-glucano no soro foi significativamente inferior no grupo sem fungemia em comparação ao grupo com fungemia definida. O melhor valor de corte da (1,3)- $\beta$ -D-glucano foi 99 pg/mL com sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão de 63,6%, 95,1%, 77,8%, 90,7% e 88,5%, respectivamente.

**Conclusão:** O ensaio de (1,3)- $\beta$ -D-glucano possui sensibilidade limitada com especificidade e valor preditivo negativo excelentes que possibilitam seu uso e ajudam na exclusão de infecção fúngica invasiva neonatal. O diagnóstico preciso e as decisões terapêuticas devem ter como base a combinação de ensaio de (1,3)- $\beta$ -D-glucano com outros achados clínicos, radiológicos e microbiológicos.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introdução**

Sepse neonatal (SN), pneumonia e meningite contabilizam 1,4 milhões de óbitos neonatais anuais em todo o mundo.<sup>1</sup> Os neonatos recém-nascidos têm alto risco de infecção devido à fase de desenvolvimento de suas barreiras imunológicas; pele frágil e tolerância imune relativa.<sup>2</sup> A sepse fúngica é um tipo de sepse de início tardio (SIT) e deve ser considerada em neonatos com internação prolongada e naqueles em tratamento prolongado com antibióticos.<sup>3</sup> A incidência de sepse fúngica varia de 0,4 a dois casos por 1.000 nascidos vivos e 3,8% a 12,9% entre os neonatos com muito baixo peso ao nascer.<sup>4</sup> Os fatores de risco mais relatados para infecção fúngica invasiva (IFI) são prematuridade, baixo peso ao nascer, malformações congênitas importantes, exposição a antibióticos de amplo espectro, cateteres venosos centrais, nutrição enteral tardia, nutrição parenteral prolongada, intubação endotraqueal, cirurgia,

esteroides pós-natais e internação prolongada em UTIN.<sup>5,6</sup> As manifestações de IFI não são específicas e a hemocultura é considerada o padrão de base para seu diagnóstico.<sup>7</sup> Infelizmente, os resultados preliminares das hemoculturas normalmente são obtidos após 48 horas ou mais. Ademais, o diagnóstico de IFI em neonatos é difícil devido à alta taxa de falso negativo de culturas,<sup>8</sup> com relação às quais, a título de exemplo, as hemoculturas são negativas em aproximadamente 50% dos casos de autópsia e comprovam candidíase disseminada.<sup>9</sup> Portanto, são necessárias novas ferramentas para o diagnóstico precoce de IFI em neonatos. O 1,3- $\beta$ -D-glucano (BG) é um componente da parede celular externa de fungos que incluem as espécies *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis jiroveci* e é liberado na corrente sanguínea durante a IFI.<sup>10</sup> Até o momento, somente três ensaios clínicos pequenos foram conduzidos em neonatos e eles concluíram que a BG é um método de diagnóstico adjunto útil de IFI.<sup>11-13</sup>

Trabalhamos com a hipótese de que a avaliação precoce de BG no soro em neonatos com suspeita de sepse fúngica é uma boa substituição da hemocultura fúngica. Dessa forma, visamos a estudar o padrão microbiológico da SIT neonatal e avaliar o desempenho diagnóstico da BG no diagnóstico precoce da IFI em neonatos com alto risco internados na UTIN.

## Indivíduos e métodos

Este é um estudo de coorte prospectivo multicêntrico feito em UNTIs do hospital infantil universitário de Almançora e do hospital geral de Almançora entre março de 2014 e fevereiro de 2016.

### Ética

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Almançora aprovou o estudo e foram obtidos os consentimentos informados por escrito dos pais de todos os neonatos incluídos no estudo.

### Indivíduos incluídos

Foram incluídos os neonatos com suspeita clínica de SIT (sepse após 72 após do nascimento) que apresentaram alto risco de IFI. As manifestações clínicas sugestivas de sepse neonatal foram divididas com o uso dos critérios da Anvisa, nos quais sepse neonatal foi definida como uma resposta sistêmica, sem outra causa reconhecida que a própria infecção, associada a dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: instabilidade térmica, apneia, pioria do desconforto respiratório, instabilidade hemodinâmica, bradicardia, intolerância alimentar, intolerância a glicose, hipoatividade e letargia.<sup>14</sup>

Os pacientes foram considerados em alto risco para IFI se apresentassem três ou mais dos seguintes critérios: baixo peso ao nascer (< 2.500g), internação por > 3 semanas, ventilação mecânica prolongada (> 1 semana), exposição sistêmica a antibióticos > 72 horas, pacientes em pós-operatório, pacientes com problemas na parede abdominal, cateter venoso central, cateter arterial > 72 horas, administração de nutrição parenteral total e trombocitopenia grave persistente apesar da administração de antibióticos de segunda linha.<sup>13</sup>

### Indivíduos excluídos

Os neonatos que receberam antifúngico sistêmico (profilático ou terapêutico), imunoglobulina intravenosa, albumina, proteína plasmática e antibiótico de amoxicilina ácido clavulânico foram excluídos de nosso estudo.

Os neonatos recrutados estavam sujeitos a investigações de SIT, como hemograma completo, total e diferencial, proteína C reativa quantitativa (PCR) e tratamento séptico completo, inclusive culturas de sangue, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como nível sérico de BG, para todos os indivíduos incluídos. Outras investigações laboratoriais e radiológicas foram feitas de acordo com a decisão do consultor responsável.

Os neonatos incluídos foram categorizados de acordo com os resultados da hemocultura em três grupos: grupo sem fungemia; incluiu 41 neonatos com hemocultura que comprovou sepse bacteriana. Grupo com fungemia definida; incluiu 11 neonatos com hemocultura que comprovou fungemia. Grupo com suspeita de fungemia; incluiu 25 neonatos com hemocultura negativa para bactérias e fungos, porém alto risco de infecção fúngica invasiva com contagem anormal de glóbulos brancos ou baixo nível de plaquetas ou nível elevado de PCR.

### Exames laboratoriais

Todos os neonatos incluídos no estudo foram submetidos a tratamento séptico completo juntamente com ensaio de BG em 24 horas a partir do recrutamento dos pacientes; 3 mL de sangue foram coletados, 1 mL para hemocultura com frascos de hemocultura (BD BactecPedsPlus™/F frascos de cultura; Becton Dickinson, Maryland, EUA) e os outros 2 mL foram para hemograma completo, PCR e análise de BG.

### Métodos

#### Hemocultura

Foi usado um sistema automatizado de hemocultura de contínuo monitoramento, BD Bactec™ FX 40 (Becton Dickinson, Maryland, EUA). Os frascos foram incubados por cinco dias antes do descarte como negativo; contudo, foram subcultivados de acordo com o procedimento operacional laboratorial caso marcados como positivos antes desse tempo. A identificação dos isolados bacterianos foi feita por morfologia das colônias, hemólise em agar de sangue, teste da Catalase com esfregados com coloração de Gram, teste de coagulase e reações bioquímicas.

A PCR foi quantificada com o ensaio turbidimétrico reforçado com látex. A turbidez é medida em 630nm com o uso do analisador Heales (Shenzhen Huisong Technology Department Co., Ltd. China).

O BG detectado com o kit de teste de ensaio Dynamiker Fungus (Dynamiker Biotechnology, Tianjin, China) em um laboratório de patologia da faculdade de medicina de Almançora. O ensaio é um ensaio colorimétrico com base em uma modificação do método de Limulus Amebocyte Lysate. A absorbância é medida em 405nm cineticamente a cada 60 segundo por 40 minutos a 37 °C com leitor Tecan (Tecan, Infinite F 50, Life Sciences, Mannedorf, Suíça).

A concentração de BG é interpretada de acordo com a curva padrão, valor > 95, 70-95 e < 70 pg/mL foram considerados positivos, ambíguos e negativos, respectivamente, e os resultados anormais foram omitidos.

### Análise de dados

A análise estatística foi feita com o *software* SPSS (IBM SPSS Estatística para Windows, Versão 20.0. NY, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para verificar a distribuição de dados normais. Os dados categóricos foram descritos com número e percentual. Os dados contínuos foram descritos com mediana, intervalo, média e desvio-padrão. O teste

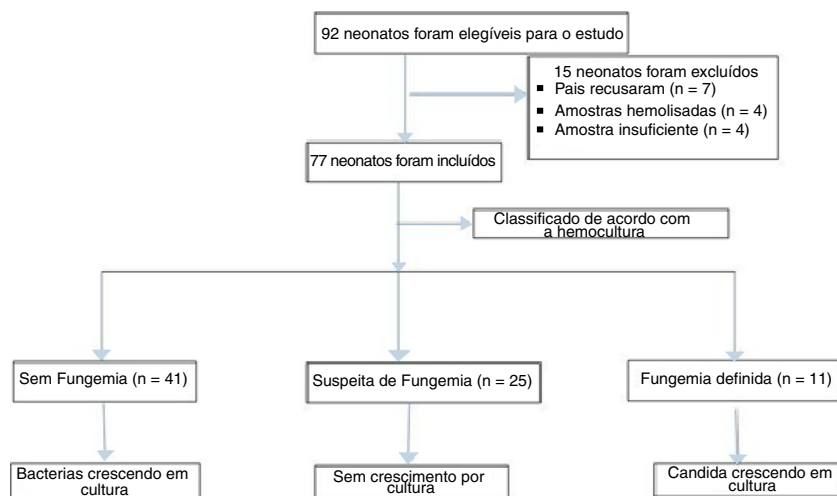


Figura 1 Fluxograma do estudo.

qui-quadrado foi usado para variáveis categóricas, Anova unidirecional para dados gaussianos e teste de Kruskal-Wallis para dados não gaussianos para comparação entre três ou mais grupos. Foram determinadas a sensibilidade e especificidade do ensaio de BG, foram calculados os valores preditivos positivos e negativos do teste e foi construída a curva ROC.

## Resultados

Durante o período do estudo, foram incluídos 77 neonatos com SIT com alto risco de IFI; os grupos de pacientes estão demonstrados no fluxograma (figura 1) do estudo. As características básicas dos grupos do estudo revelaram que a idade gestacional e o peso ao nascer foram significativamente menores em pacientes com fungemia definida, em comparação com os grupos sem fungemia e com suspeita de fungemia. Idade pós-natal, parto cesáreo e sexo masculino foram significativamente maiores em pacientes com fungemia definida, em comparação com os pacientes sem fungemia e suspeita de fungemia (tabela 1). Baixo peso ao nascer, internação > 3 semanas, dispositivo central, trombocitopenia persistente, glóbulos brancos e PCR foram significativamente maiores em pacientes com fungemia definida, em comparação com os outros dois grupos, apesar de ventilação mecânica ou pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP) > 1 semana terem sido significativamente maiores em pacientes com fungemia definida em comparação somente com o grupo sem fungemia (tabela 1). Bactérias gram-negativas foram mais predominantes do que as bactérias gram-positivas, com uma frequência de 32/54 e 11/54, respectivamente. Os organismos em crescimento foram: *Klebsiella* spp 14/54; *E. coli* 12/54; *Staphylococcus* Spp 12/54 (*Staph* coagulase negativa 9/54; *S. aureus* 3/54); *pseudomonas aeruginosa* 3/54 e *Proteus* spp 2/54. Além disso, foram isoladas 11/54 espécies de *Candida*. Duas hemoculturas neonatais revelaram crescimento misto de *Candida* com bactérias.

Os resultados do ensaio de BG foram negativos em 34, ambíguos em 23 e positivos em 20 casos. O grupo sem

fungemia foi significativamente associado a resultados negativos de BG, em comparação com o fungemia definida ( $p = 0,005$ ); e o Grupo com fungemia definida foi significativamente associado a resultados positivos de BG, em comparação com o sem fungemia ( $p = 0,001$ ).

Em todos os neonatos estudados, a mediana e os intervalos de concentrações de BG são demonstrados na (figura 2). A concentração de BG foi significativamente maior no grupo com fungemia definida em comparação com os grupos sem fungemia e com suspeita de fungemia ( $p = 0,001$  e  $p = 0,011$ , respectivamente) (figura 2). A sensibilidade e especificidade do ensaio de BG no nível 99 pg/mL foram 63,6% e 95,1% respectivamente. Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) foram 77,8% e 90,7% respectivamente, com precisão de 88,5%. A área na curva de operação do receptor (ROC) foi 0,837 (IC de 95% [0,689-0,985]) ( $p = 0,001$ ) (figura 3).

## Discussão

Apesar do desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, a mortalidade e as complicações fatais das IFIs são frequentemente relatadas em pacientes gravemente doentes.<sup>15</sup> O diagnóstico de IFI nosocomial é afetado negativamente por resultados de cultura subótimos. Portanto, são necessárias novas ferramentas para o diagnóstico precoce de IFI em neonatos.

Em nosso estudo, testamos prospectivamente o padrão microbiológico da SIT neonatal na corrente sanguínea e avaliamos o desempenho diagnóstico do ensaio de BG no soro no diagnóstico precoce de IFI em neonatos de alto risco internados em UTIs.

Em nosso estudo, os isolados mais prevalentes foram bactérias Gram-negativas (57,2%), principalmente *Klebsiella* spp, representaram 25,9% dos casos de cultura positiva. Da mesma forma, múltiplos estudos relataram patógenos Gram-negativos como o isolado bacteriano predominante na sepse neonatal, *Klebsiella pneumoniae* foi o organismo mais frequentemente detectado.<sup>16,17</sup> Ademais, Al-Shamahy et al. conduziram um estudo em Sanaa (Iêmen) e relataram

**Tabela 1** Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

	Sem fungemia n = 41	Suspeita de fungemia n = 25	Fungemia definida n = 11	<i>p</i> <sup>a</sup>	<i>p</i> <sup>b</sup>	<i>p</i> <sup>c</sup>	<i>p</i> <sup>d</sup>
Idade gestacional (semanas)	33,41 $\pm$ 3,294	33,08 $\pm$ 3,511	30 $\pm$ 0,256	0,045	0,069	0,037	0,007
Idade pós-natal (dias)	23,76 $\pm$ 8,249	21,08 $\pm$ 7,205	30,91 $\pm$ 6,236	0,003	0,173	0,008	0,001
Peso ao nascer (gramas)	2100 (850-3900)	1880 (830-4700)	930 (830-3350)	0,038	0,041	0,020	0,018
Sexo masculino	28 (68,3%)	13 (52%)	11 (100%)	0,007	0,187	0,031	0,005
Parto cesáreo	32 (78%)	19 (76%)	11 (100%)	0,041	0,847	0,047	0,035
Ruptura prolongada de membranas	28 (68,3%)	18 (72%)	7 (63,6%)	0,892	0,751	0,770	0,616
Baixo peso ao nascer (< 2500 g)	30 (73,2%)	16 (64%)	10 (90,9%)	0,026	0,432	0,015	0,027
Internação > 3 semanas	30 (73,2%)	15 (60%)	11 (100%)	0,038	0,265	0,043	0,016
Ventilação mecânica ou CPAP > 1 semana	36 (87,8%)	22 (88%)	11 (100%)	0,049	1	0,041	0,538
Exposição sistêmica a antibióticos >72 horas	33 (80,5%)	20 (80%)	9 (81,8%)	1	1	1	1
Intervenção cirúrgica	4 (9,8%)	5 (20%)	0 (0,0%)	0,367	0,282	0,567	0,295
Cateter venoso central ou arterial > 72 horas	23(56,1%)	15 (60%)	10 (90,9%)	0,003	0,756	0,040	0,016
Administração total por nutrição parenteral	34 (82,9%)	20 (80%)	11 (100%)	0,355	0,754	0,322	0,295
Trombocitopenia persistente < 100X10 <sup>9</sup> /L	31 (75,6%)	14 (56%)	10 (90,9%)	0,041	0,047	0,420	0,049
Hemoglobina (g/dL)	11,5 (7,5-18,5)	12,8 (9,3-17,8)	10,3 (9,3-13,5)	0,113	0,947	0,858	0,797
Glóbulos brancos (X10 <sup>9</sup> /L)	6 (1,9-28,2)	7 (1,9-28,1)	11,5 (3,4-26,3)	0,027	0,077	0,013	0,004
PCR (mg/L)	48 (12-208)	48 (12-112)	96 (12-210)	0,022	0,252	0,024	0,042

Dados expressos como número (percentual), média  $\pm$  DP ou mediana (intervalo).

CPAP, pressão positiva contínua nas vias aéreas; PCR, proteína C reativa.

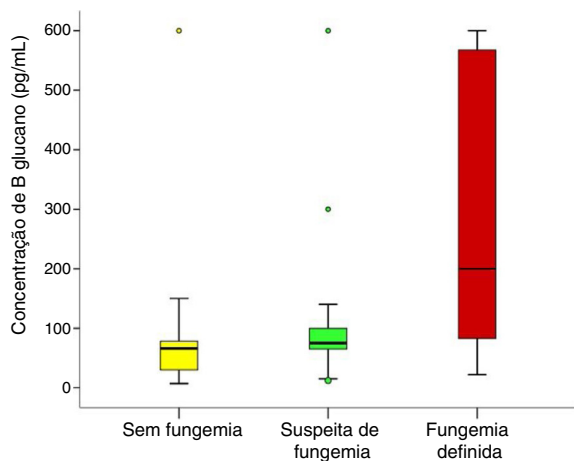
<sup>a</sup> Comparação entre todos os grupos.

<sup>b</sup> Comparação entre sem fungemia e suspeita de fungemia.

<sup>c</sup> Comparação entre sem fungemia e fungemia definida.

<sup>d</sup> Comparação entre suspeita e fungemia definida.

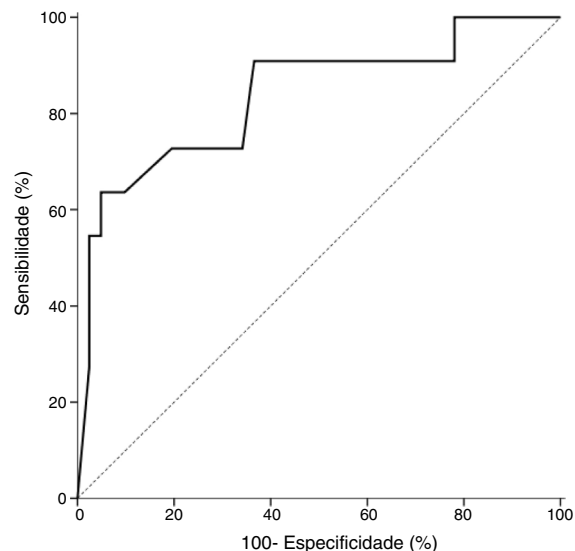
Foram usados os testes de qui-quadrado, Anova unidirecional e Kruskal-Wallis.



**Figura 2** Níveis de 1,3- $\beta$ -D-glucano nos neonatos do estudo.

uma taxa muito elevada de bactérias Gram-negativas, representaram 97,8% do total de isolados, *Klebsiella ssp* foi o patógeno mais predominante (36,7%)<sup>18</sup> Em contrapartida, Hornik et al. contataram que os organismos Gram-positivos representaram 45-75% das causas de SIT em neonatos.<sup>19</sup>

Os fungos representaram 20,3% dos casos de cultura positiva em nosso estudo. Da mesma forma, um estudo multicêntrico feito por Cotton et al. demonstrou que a taxa de IFIs foi 2,4% a 20,4% em neonatos com extremo baixo peso ao nascer.<sup>20</sup> Contudo, um grande estudo retrospectivo demonstrou uma incidência muito baixa de IFIs (0,06%) em neonatos



**Figura 3** Curva ROC de 1,3- $\beta$ D-glucano para discriminação entre os grupos sem fungemia e fungemia definida.

com peso ao nascer > 1.500 g.<sup>21</sup> A alta incidência de IFIs em nosso estudo pode ser explicada pelo fato de que incluímos neonatos que apresentaram três ou mais fatores de risco para infecção fúngica, além da falta de higiene rigorosa em países em desenvolvimento. Em nosso estudo, *Candida albicans* foi o único crescimento fúngico isolado que está de acordo com os resultados de Hope et al., que declararam que

a *Candida albicans* é a espécie de *Candida* mais frequente, causa candidíase invasiva em neonatos.<sup>22</sup>

Com relação ao ensaio de BG em nosso estudo, no grupo sem fungemia 23 foram negativos, 14 foram ambíguos e quatro foram positivos, ao passo que no grupo com fungemia definida, sete foram positivos, três ambíguos e um foi negativo. As reações de BG falso-positiva supostamente ocorrem em pacientes tratados com imunoglobulinas intravenosas, albumina, fatores coagulantes e fração de proteína plasmática fabricada por determinados fornecedores de produtos fúngicos ou antibióticos derivados de fontes fúngicas, como amoxicilina, que foram excluídos de nosso estudo. Os pacientes expostos a gaze ou materiais que contêm glucanos durante a cirurgia, dano na mucosa proveniente de quimioterapia ou radioterapia, contaminação experimental por BG devido à manipulação excessiva de uma amostra, algum *Streptococci* e *Pseudomonas aeruginosa* também podem causar reatividade falso positiva.<sup>23,24</sup> Ademais, Zheng et al. relataram que a terapia com corticosteróides pós-natal pode causar resultado de BG falso positivo.<sup>25</sup> Em nosso estudo, dois neonatos no grupo sem fungemia apresentaram histórico de cirurgia recente, com possibilidade de exposição a materiais que continham glucano. Além disso, a *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada dos três neonatos no grupo sem fungemia, o que pode explicar sua reatividade falso positiva. No grupo com suspeita de fungemia de nosso estudo, nove dos neonatos incluídos apresentaram reação positiva a BG, que pode ser explicada pela baixa sensibilidade da hemocultura no diagnóstico de candidíase invasiva, pois apenas 50% da candidíase invasiva são positivas para hemocultura.<sup>9</sup> Adicionalmente, os fungos que não *Candida*, como *Aspergillus*, podem ser a causa da BG positiva nesses pacientes, pois as hemoculturas são quase sempre negativas em *aspergillosis* disseminada.<sup>26</sup> Por fim, o resultado falso negativo da BG em um paciente no grupo com fungemia definida pode ser explicado pela IFI em um estágio inicial.

A sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e precisão do ensaio de BG em nosso estudo, em um ponto de corte de 95 pg/mL de acordo com as recomendações do fabricante (após considerar os resultados ambíguos como negativos), foram de 63,6%, 90,2%, 63,6%, 90,2% e 84,6%, respectivamente, em comparação com 90%, 56,1%, 35,15, 95,8% e 63,5%, respectivamente, em um ponto de corte  $\geq 70$  pg/mL (após considerar os resultados ambíguos como positivos), ao passo que, no melhor valor de corte obtido (99 pg/mL), esses níveis foram 63,6%, 95,1%, 77,8%, 90,7% e 88,5% respectivamente. No presente estudo, a especificidade do ensaio de BG usada para diagnóstico precoce de IFIs é 95,1%, ao passo que sua sensibilidade (63,6%) é limitada a um valor de corte ideal de 99 pg/mL. A especificidade e o VPN excelentes sugerem uma boa capacidade de o ensaio de BG excluir IFI em neonatos com suspeita, apesar de sua capacidade de diagnosticar a doença ser limitada. Assim, o ensaio de BG é mais bem combinado com outros achados clínicos, radiológicos e microbiológicos para melhorar sua sensibilidade. O valor principal do ensaio de BG é excluir a presença de IFIs com base em um resultado negativo, que eliminaria a necessidade de terapia antifúngica tóxica e cara.

Em uma população semelhante anteriormente estudada, os neonatos com suspeita clínica de sepse de início tardio com alto risco de fungemia mostraram sensibilidade,

especificidade, VPP e VPN do ensaio de BG, no nível de 60 pg/mL, de 73,2%, 71,0%, 76,9% e 66,7%, respectivamente, ao passo que no nível de 80 pg/mL foram 70,7%, 77,4%, 80,6% e 66,7%, respectivamente.<sup>13</sup> Por outro lado, um estudo retrospectivo feito por Goudjil et al. relatou que os níveis de BG aumentaram na IFI neonatal, com valor de corte ideal para positividade de BG  $> 125$  pg/mL. A sensibilidade e especificidade nesse valor de corte foram de 84% e 75% respectivamente.<sup>11</sup> Ademais, um estudo feito por Zhao et al. constatou que a sensibilidade da BG no diagnóstico de IFI nos níveis de corte  $\geq 10$  pg/mL,  $\geq 200$  pg/mL e  $\geq 400$  pg/mL foi de 68,3%, 49,2% e 33,3% respectivamente, ao passo que sua especificidade foi de 75,6%, 91,3% e 96,3% respectivamente. Contudo, a BG no soro foi medida em seu estudo por uma técnica diferente da usada no nosso e os valores de BG  $< 10$  pg/mL foram interpretados como negativos e valores  $> 20$  pg/mL como positivos.<sup>12</sup> Adicionalmente, Liu et al., avaliaram o ensaio de BG para diagnóstico de candidemia em pacientes pediátricos; eles relataram resultados semelhantes aos de nosso estudo, com sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 68%, 91%, 66%, e 91% respectivamente. Eles concluíram que o ensaio de BG no plasma tem uma eficácia moderada para auxiliar no diagnóstico de candidemia em pacientes pediátricos, ao passo que é útil para descartar candidemia devido a seu alto VPN.<sup>27</sup>

Em uma metanálise que incluiu 31 estudos, concluiu-se que a BG tem sensibilidade de 80% e especificidade de 82% no diagnóstico de IFI. Contudo, a maior parte dos estudos incluídos nessa metanálise foi de adultos.<sup>28</sup> Em uma metanálise mais recente feita por Hou et al.,<sup>29</sup> foram analisados 1.068 pacientes de diferentes faixas etárias de 11 estudos, a sensibilidade, especificidade, índice probabilidade positiva, índice de probabilidade negativa, razão de chance de diagnóstico e área na curva resumida da característica de operação do receptor em conjunto, com intervalo de confiança de 95%, foram 0,75 (0,63,0,84), 0,87 (0,81,0,92), 5,85(3,96,8,63), 0,30 (0,20,0,45), 19,53(11,16,34,18) e 0,89(0,86,0,91) respectivamente.<sup>29</sup>

É evidente que o valor de corte da BG no soro pode variar de acordo com os kits e as técnicas usados nesse ensaio; em nosso estudo, o melhor valor de corte obtido para diagnóstico de IFI foi de 99 pg/mL por meio da técnica Dynamiker Fungus. Enquanto isso, de acordo com uma análise sistemática e metanálise conduzidas por He et al., para avaliar a precisão de diagnóstico da BG no soro para IFI, 60 pg/mL apresentaram a melhor precisão de diagnóstico com o ensaio de Fungitell, 20 pg/mL apresentaram a melhor precisão de diagnóstico com o ensaio Fungitec G-Test (Seikagaku Corporation, Tóquio, Japão) e 11 pg/mL apresentaram a melhor precisão de diagnóstico com o ensaio de Wako (Wako Chemicals, VA, EUA).<sup>30</sup>

Reconhecemos as limitações de nosso estudo, como pequeno tamanho da amostra, coorte heterogênea de neonatos recém-nascidos, dois diferentes centros manipularam as amostras e o uso de hemocultura como padrão de base para diagnóstico das IFIs, que é positivo em 50% dos casos. Adicionalmente, a limitação da BG em si como algo caro, principalmente em países em desenvolvimento, sem identificação de espécies por ela.

É difícil calcular o desempenho real do teste de BG, devido à baixa sensibilidade da hemocultura, porém com

dados disponíveis o teste de BG tem uma sensibilidade limitada e excelente especificidade que possibilita seu uso como auxílio no diagnóstico ou exclusão de sepse neonatal fúngica. O ajuste do valor de corte de BG para 99 pg/mL parece ser adequado quando não há outra causa de reatividade falsa. O valor preditivo negativo nesse nível pode excluir a presença de fungemia em 90,7%, com base em um resultado negativo. Recomendamos que o diagnóstico preciso e as decisões terapêuticas tenham como base a combinação do ensaio de BG com outros achados clínicos, radiológicos e microbiológicos, devido à sua sensibilidade limitada.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

- Motta M, Zini A, Regazzoli A, Garzoli E, Chirico G, Caimi L, et al. Diagnostic accuracy and prognostic value of the CD64 index in very low birth weight neonates as a marker of early-onset sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2014;45:433–9.
- Makhoul IR, Kassis I, Smolkin T, Tamir A, Sujov P. Review of 49 neonates with acquired fungal sepsis: further characterization. *Pediatrics*. 2001;107:61–6.
- Filioti J, Spiroglou K, Panteliadis CP, Roilides E. Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. *Intensive Care Med*. 2007;33:1272–83.
- Schuchat A, Zywicki SS, Dinsmoor MJ, Mercer B, Romaguera J, O'Sullivan MJ, et al. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics*. 2000;105:21–6.
- Kelly MS, Benjamin DK, Smith PB. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants. *Clin Perinatol*. 2015;42:105–17.
- Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald SA, Oh W, Higgins RD, et al. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months. *Pediatrics*. 2006;117:84.
- Arnon S, Litmanovitz I. Diagnostic tests in neonatal sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21:223–7.
- Calley JL, Warris A. Recognition and diagnosis of invasive fungal infections in neonates. *J Infect*. 2017;74:S108–13.
- 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;56:1284–92.
- Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, Kedzierska J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:755–66.
- Goudjil S, Kongolo G, Dusol L, Imestouren F, Cornu M, Leke A, et al. (1-3)- $\beta$ -D-Glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26:44–8.
- Zhao D, Qiu G, Luo Z, Zhang Y. Platelet parameters and (1,3)- $\beta$ -D-glucan as a diagnostic and prognostic marker of invasive fungal disease in preterm infants. *PLOS ONE*. 2015;10:0123907.
- Mackay CA, Ballot DE, Perovic O. Serum 1,3-betaD-glucan assay in the diagnosis of invasive fungal disease in neonates. *Pediatr Rep*. 2011;3:e14.
- De Assis Meireles L, Vieira AA, Costa CR. Evaluation of the neonatal sepsis diagnosis: use of clinical and laboratory parameters as diagnosis factors. *Rev Esc Enferm USP*. 2011;45:33–9.
- De Vlieger G, Lagrou K, Maertens J, Verbeke E, Meersseman W, Van Wijngaerden E. Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3783e7.
- Labib AZ, Mahmoud AB, Eissa NA, El Gendy FM, Soliman MA, Aly AA. Early diagnosis of neonatal sepsis: a molecular approach and detection of diagnostic markers versus conventional blood culture. *Int J*. 2013;4:77–85.
- Verma P, Berwal PK, Nagaraj N, Swami S, Jivaji P, Narayan S. Neonatal sepsis: epidemiology, clinical spectrum, recent antimicrobial agents and their antibiotic susceptibility pattern. *Int J Contemp Pediatr*. 2015;2:176–80.
- Al-Shamahy HA, Sabrah AA, Al-Robasi AB, Naser SM. Types of bacteria associated with neonatal sepsis in Al-Thawra University Hospital, Sana'a, Yemen, and their antimicrobial profile. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2012;12:48–54.
- Hornik CP, Fort P, Clark RH, Watt K, Benjamin DK Jr, Smith PB, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*. 2012;88:69–74.
- Cotten CM, McDonald S, Stoll B, Goldberg RN, Poole K, Benjamin DK Jr. The association of third-generation cephalosporin use and invasive candidiasis in extremely low birth-weight infants. *Pediatrics*. 2006;118:717–22.
- Lee JH, Hornik CP, Benjamin DK Jr, Herring AH, Clark RH, Cohen-Wolkowicz M, et al. Risk factors for invasive candidiasis in infants >1500 g birth weight. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:222–6.
- Hope WW, Castagnola E, Groll AH, Roilides E, Akova M, Arendrup MC, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:38–52.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5957–62.
- Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij PE. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1930–1.
- Zheng F, Zha H, Yang D, Deng J, Zhang Z. Diagnostic values and limitations of (1,3)- $\beta$ -D-glucans and galactomannan assays for invasive fungal infection in patients admitted to pediatric intensive care unit. *Mycopathologia*. 2017;182:331–8.
- Arendrup MC, Fisher BT, Zaoutis TE. Invasive fungal infections in the pediatric and neonatal population: diagnostics and management issues. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:613–24.
- Liu Y, Chen F, Zhu X, Shen L, Zhang SX. Evaluation of a novel plasma (1,3)- $\beta$ -D-glucan detection assay for diagnosis of candidemia in pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3017–20.
- Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3- $\beta$ -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2012;50:7–15.
- Hou TY, Wang SH, Liang SX, Jiang WX, Luo DD, Huang DH. The screening performance of serum 1,3-beta-D-glucan in patients with invasive fungal diseases: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PLOS ONE*. 2015;10:e0131602.
- He S, Hang JP, Zhang L, Wang F, Zhang DC, Gong FH. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- $\beta$ -D-glucan for invasive fungal infection: focus on cut off levels. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015;48:351–61.