

DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSE *in vivo*: UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA SANDUÍCHE- GALACTOMANANA EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PINGUINS-DE-MAGALHÃES EM CATIVEIRO

VITTÓRIA BASSI DAS NEVES¹; ÂNGELA LEITZKE CABANA²; MELISSA ORZECOWSKI XAVIER²; RODOLFO PINHO DA SILVA FILHO²; RENATA OSÓRIO DE FARIA²; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES³

¹Universidade Federal de Pelotas-Graduanda em Medicina Veterinária – vick.bassi@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas-Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária – cabanangela@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas-Veterinária Preventiva –meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A aspergilose é uma infecção micótica oportunística que acomete trato respiratório superior como sítio primário, podendo atingir trato respiratório inferior, ocasionando quadros mais graves (CABANA *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da aspergilose relaciona-se com o tamanho do inoculo fúngico e principalmente com a imunossupressão do hospedeiro. Características anatômicas tornam as aves mais susceptíveis à infecção por *Aspergillus* spp. (XAVIER, 2007), com maior frequência de *A. fumigatus* (XAVIER, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A enfermidade é frequente em pinguins em cativeiro, sendo associada a altas taxas de mortalidade nesses animais e interferindo no seu processo de reabilitação, já os de vida livre raramente desenvolvem a doença. Quando em reabilitação, essas aves encontram-se debilitadas devido ao esforço físico proveniente de sua migração e fatores como manejo diário, interferem, tornando-as mais pré-dispostas a desenvolver a enfermidade ou potencializar alguma infecção já existente (CABANA *et al.*, 2007; XAVIER, 2007).

O grande desafio no manejo das enfermidades causadas por *Aspergillus* sp. é a obtenção de diagnóstico precoce, para tanto, utilizam-se exames como cultura fúngica, exames histopatológicos ou sorologia (XAVIER *et al.*, 2011). Nos pinguins, a maioria dos casos de aspergilose é confirmada utilizando exames *post-mortem* (XAVIER *et al.*, 2007).

A detecção de galactomanana (GM), polissacarídeo termoestável presente na parede celular dos fungos e liberado durante o crescimento das hifas nos tecidos é um método utilizado para monitorar pacientes em risco de aspergilose invasiva (AI) (MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004).

Este polissacarídeo é detectado pela técnica de ELISA sanduíche, através do teste comercial PlateliaAspergillus® (BioRad- França) detectando níveis baixos da GM circulante no plasma sanguíneo ou outros fluídos corporais (CRAY *et al.*, 2011; AQUINO *et al.*, 2007; ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004).

A principal aplicabilidade do método de ELISA sanduíche disponível comercialmente está no monitoramento dos níveis séricos de GM em pacientes de risco para AI (XAVIER *et al.*, 2011; MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004). Quando monitorada de forma seriada, a GM, antecipa o diagnóstico de AI em um intervalo de 6 a 14 dias em indivíduos neutropênicos (SINGH, 2005).

Nesse contexto, o monitoramento sorológico através da técnica de ELISA sanduíche apresenta-se como uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce da

doença também em pinguins (XAVIER *et al.*, 2011; XAVIER, 2007; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

Esse trabalho tem por objetivo descrever a utilização do teste de ELISA sanduíche para detecção de GM em amostras clínicas de lavado traqueobrônquico de um grupo de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) com quadro clínico de aspergilose, como tentativa de preconizar posteriormente um *cutt-off* para referência do diagnóstico da doença.

2. METODOLOGIA

Durante o período quatro meses no ano de 2015, foram realizados testes de ELISA sanduíche para detecção do antígeno GM em 30 amostras de LTB de pinguins-de-Magalhães com quadro clínico de aspergilose.

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos a partir das amostras já estocadas a -20°C junto ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina-FAMED/FURG. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços tipo sanduíche, utilizando-se apenas 2-3 tiras por teste. Todo protocolo foi realizado através do kit comercial Platelia *Aspergillus* EIA®, Bio-Rad, seguindo as instruções do fabricante.

As amostras utilizadas para o teste de GM eram provenientes de animais que vieram a óbito, suspeitos ou diagnosticados com aspergilose através de exames histopatológicos e cultura fúngica, os quais possuíam também teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) positivo, entre 7-30 dias anterior ao óbito.

O teste de IDGA detecta anticorpos em amostras clínicas de animais e humanos e foi utilizado como parte de estudo anterior para triagem dos animais em reabilitação predispostos a aspergilose.

Os animais utilizados no estudo apresentaram também sinais clínicos respiratórios compatíveis com aspergilose e culturas de lavado traqueobrônquico compatíveis com *A. fumigatus*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 amostras de LTB analisadas, vinte e seis (86,66%) foram positivas (com valores acima de 0,5- segundo protocolo do kit comercial), ocorrendo em apenas quatro delas resultados negativos (valores abaixo de 0,5- média 0,37). Os valores obtidos até agora corroboram com o que foi observado por Xavier *et al.* (2011), Xavier (2007) e Abundis-Santamaria (2003), que afirmaram ser o teste de ELISA eficaz para detecção precoce da doença em outras espécies. Foi possível ainda, observar a eficácia de amostras de LTB como utilizáveis para detecção *in vivo* da doença nos pinguins, conforme foi descrito anteriormente por Aquino *et al.* (2007), Mennink-Kersten *et al.* (2004) e Hopwood *et al.* (1995) em humanos.

Em pinguins, existem poucos estudos a respeito de métodos diagnósticos *in vivo* para aspergilose, sendo descritos estudos através da detecção de antígeno galactomanana, anticorpos circulantes e detecção de antígeno β -glucana (BURCO *et al.*, 2012; CRAY *et al.*, 2009 a, b; GERMAN *et al.*, 2002), justificando assim a nossa pesquisa e interesse em definir *cutt-off* para esta espécie animal.

Contudo, existem estudos que corroboram com a eficácia da detecção de GM para diagnóstico em aves, como o nosso estudo. Cray *et al.*, (2009 a, b) e Arca-Ruibal *et al.*, (2006) testaram a eficácia da detecção de GM sérica para diagnóstico da aspergilose em falcões pelo mesmo método aqui utilizado, utilizando soro sanguíneo como amostra e obtiveram uma sensibilidade de 12% e

especificidade de 95% e sensibilidade 67% e especificidade 73% respectivamente.

Em nosso estudo, estas variáveis também serão testadas no momento da utilização de grupo controle negativo para comparação e determinação de sensibilidade e especificidade. Porém os resultados preliminares do estudo mostraram-se promissores, apenas ao avaliar a frequência e possibilidade de utilização de amostras clínicas de LTB nesta espécie em cativeiro, não considerando, neste caso, possíveis reações cruzadas.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos testes ELISA neste estudo, conclui-se que amostras clínicas de fácil obtenção, como LTB, podem ser utilizadas para diagnóstico *in vivo* da aspergilose em pinguins. Tal afirmativa pode ser justificada baseando-se em estudos anteriores em aves e principalmente partindo de estudos na espécie humana, uma vez que o kit comercial atualmente possui instruções do fabricante para utilização desse tipo de amostra clínica.

Porém, para confirmar tal afirmativa, necessita-se de maiores estudos com grupos controle negativos e avaliação de reações cruzadas e interferência ambiental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUNDIS-SANTAMARIA E. **Aspergillosis in birds of prey**. Free Eletronic Library – Theses, Abstracts, Dissertations, 2003. Abstracts, dissertations. Acessado em 15 de julho 2015. Online. Disponível em: <http://www.ab.xlibx.com/1other/9573-1-aspergillosis-birds-prey-mvz-edgar-abundis-santamaria-edited-ro.php>.

AQUINO V; GOLDANI L. Z; PASQUALOTO A.C. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Mycopathologia**, Berkeley, v.4, n.163, p. 191–202, 2007

ARCA- RUIBAL B; WERNERY U; ZACHARIAH R; BAILEY T.A; SOMMA A.D; SILVANOSE C; MCKINNEY P. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. **Veterinary Record**, London, v 158, n 13, p 442-444, 2006

BURCO J.D; ZICCARDI M.H; CLEMONS K.V. Evaluation of Plasma (1→3) β -D-glucan Concentrations in Birds Naturally and Experimentally Infected with *Aspergillus fumigatus*. **Avian Disease**, LA, v. 56, n. 1, p 183-191, 2012

CABANA, A. L. **Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de conhecimento: Sanidade Animal – Veterinária Preventiva). Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

CABANA, A.L; XAVIER, M.O; OSÓRIO, L.G; SOARES, M.P; SILVA-FILHO, R.P; MADRID, I.M; FARIA, R.O; MEIRELES, M.C.A. Alterações anatomo-patológicas da aspergilose em pinguins. In: **XVI Congresso de Iniciação Científica/UFPel**,

16. Pelotas, Nov 2007. Anais Ciências Agrárias. Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, 2007. p. 1 – 4.

CRAY, C; WATSON, T; ARHEART, K.L. Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. **Avian Disease**, Los Angeles, v. 53, n. 4, p. 491–494, 2009a.

CRAY, C; WATSON, T; RODRIGUEZ, M; ARHEART, K.L. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. **Journal of zoo and wild life medicine**, United States, v.40, n. 1, p. 64–70, 2009b.

CRAY, C. Infectious and zoonotic disease testing in pet birds. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Milwaukee, v. 31, n. 1, p. 71-85, 2011.

GERMAN, A.C; SHANKLAN, G.S; EDWRDS, J; FLACH, E.J. Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 16, p. 513-518, 2002.

HOPWOOD, V; JOHNSON, E.M; CORNISH, J.M; FOOT, A.B; EVANS, E.G; WARNOCK, D.W. Use pastorex aspergillus antigen latex agglutination test for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Journal Clinical Pathology**. East Sussex, v. 48, n. 3, p. 210-213, 1995

MENNINK-KERSTEN, M.A; DONNELLY, J.P; VERWEIJ, P.E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. **The Lancet- Infectious Diseases**. Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 349-57, 2004.

OLIVEIRA, T. B; CABANA, A. L; XAVIER, M. O; VALLE, B; MARTINS, A. M; MEIRELES, M.C.A. Aspergilose: elevada taxa de mortalidade em pingüins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) com envolvimento do sistema respiratório. In: **XXII Congresso de Iniciação Científica/UFPel**, 22., Pelotas, Nov 2013. Anais Ciências Agrárias. Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2013. p. 1 – 5.

SINGH, N; PATERSON, D.L. *Aspergillus* Infections in Transplant Recipients. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 1, p. 44-69, 2005.

XAVIER, M.O; PASQUALOTTO, A.C. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**. Belo Horizonte Vol. 1, n.1, Janeiro / fevereiro / março. 2011.

XAVIER, M.O. **Aspergilose em Pingüins em Cativeiro: Diagnóstico, Prevenção e Controle em Centro de Recuperação de Animais Marinhos**. 2007. Dissertação (Mestrado em ciências – área do conhecimento: Veterinária Preventiva) Programa de Pós- Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.