

PLATELIA EIA® *Aspergillus* NO DIAGNÓSTICO DA ASPERGILOSE EM PINGÜINS

VITTORIA BASSI DAS NEVES¹; ÂNGELA LEITZKE CABANA²; MELISSA ORZECOWSKI XAVIER³; JOSIARA FURTADO MENDES⁴; ALESSANDRA JACOMELLI TELES⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – vick.bassi@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - cabanangela@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – melissaxavier@ig.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – josiara.mds@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – aleteles@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas –meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A aspergilose é uma micose oportunista (AQUINO *et al.*, 2007), de caráter invasivo, não contagiosa e de origem multifatorial. A ocorrência da infecção depende da exposição ao agente, tamanho do inoculo fúngico, resposta imune do hospedeiro e virulência da cepa (RICHARDSON; WARNOCK, 2003).

É uma doença freqüente em pinguins em cativeiro, apresentando altas taxas de mortalidade (CABANA *et al.*, 2007). A alta susceptibilidade nesses animais justifica-se por características anatômicas das aves (TELL, 2005) e pelo desgaste físico dos pinguins no processo de migração e reabilitação, onde se tornam imunossuprimidos (CABANA *et al.*, 2007).

O obstáculo enfrentado no manejo da aspergilose é a obtenção de diagnóstico precoce definitivo, já que este normalmente é feito *post-mortem* através do cultivo fúngico e microscopia, histopatologia e exame sorológico, aliados à história clínica do paciente (XAVIER *et al.*, 2011). O teste de ELISA é um dos exames sorológicos que pode ser feito para detectar a presença de antígenos fúngicos, como por exemplo, a galactomanana (GM) (MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004) antecipando o diagnóstico de aspergilose invasiva (AI) (SINGH, 2005).

O polissacarídeo GM é detectado pela técnica de ELISA sanduíche, através do teste comercial Platelia *Aspergillus* EIA (BioRad)®, o qual reconhece baixos índices de GM em plasma ou outros fluidos corporais, como lavado traqueobrônquico (LTB) (ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do teste Platelia *Aspergillus* EIA (BioRad)® para o diagnóstico de aspergilose invasiva (AI) em pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) com quadro clínico de aspergilose; determinando sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo para diferentes pontos de corte.

2. METODOLOGIA

Neste estudo estudo, foram avaliadas amostras oriundas de pinguins-de-Magalhães em cativeiro que vieram a óbito por aspergilose, provenientes de soro sanguíneo (n=29) e de lavado traqueobrônquico (LTB) (n=23). Foram também incluídas 23 amostras de soro sanguíneo de pinguins saudáveis para o grupo controle. Todas as amostras foram obtidas em um período entre 7 a 60 dias antes do óbito (grupo caso) ou libertação (grupo controle). As amostras foram estocadas

no Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina - FAMED/FURG, a -20°C , e todos os casos foram confirmados por exames *post-mortem* de cultura fúngica e histopatológico.

O teste de ELISA para detecção de GM foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (BioRad)®.

Para obter a taxa de GM foi realizada a divisão entre a média da densidade ótica (DO) da duplicata da amostra clínica e a média da DO da duplicata da amostra de ponto de corte fornecida pelo fabricante. O programa SPSS 20.0, IBM® foi utilizado para análise estatística, através dos testes de qui-quadrado e Kruskal-Wallis. A partir da curva ROC, calculou-se as taxas de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos considerando quatro diferentes pontos de corte (0,5; 1,0; 1,5; 2,0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras séricas - dos grupos caso e controle - que foram avaliadas, nenhuma apresentou diferença nos índices de GM ($p_{KW}=0,097$). Nos animais doentes, as taxas de GM variaram entre 0,29 e 6,5; e nos hígidos, os valores ficaram entre 0,31 e 4,38. Foram obtidas, a partir dos quatro pontos de corte e da curva ROC, taxas de sensibilidade (que variaram de 86,2% a 34,5%), e de especificidade (que ficaram entre 91,3% e 26,1%).

Nas amostras de LTB, o índice de GM variou de 0,2 a 11,7; possuindo apenas três animais apresentando valores abaixo de 0,5, representando o ponto de corte considerado negativo para as amostras padronizadas pelo fabricante. Três apresentaram valores entre 0,5 e 1,0; três entre 1,0 e 1,5; e os dezoito animais restantes apresentaram valores iguais ou superiores a 2,0. Entretanto, através da necrópsia, foi possível observar que todos estes animais apresentavam lesões no trato respiratório compatíveis com aspergilose.

Outros estudos, como por exemplo os realizados por Cray *et al.*, (2009 a) e Arca-Ruibal *et al.*, (2006), que avaliaram a eficácia da detecção de GM para o diagnóstico da aspergilose em aves, comprovam que o teste é uma ferramenta útil na detecção da doença em falcões; contrariamente aos resultados encontrados em nosso estudo com pinguins-de-Magalhães. Esses autores encontraram taxas de sensibilidade que variam entre 12% e 67%, e de especificidade entre 73% e 95%, enquanto nós encontramos altas taxas de sensibilidade (até 86,2%), e taxas de especificidade a partir de 26,1%.

Alguns autores, como Le Loc'h *et al.*, (2005), acreditam que as altas taxas de falso positivos encontradas nos testes podem estar relacionadas com infecções provocadas por *Aspergillus fumigati*, exposição a alta carga fúngica ou pela ocorrência de reação cruzada. Quanto aos falso positivos, segundo Xavier (2011), eles normalmente se devem à encapsulação da infecção, formação de imunocomplexos, ou exposição prévia ao antígeno fúngico em medidas profiláticas.

De acordo com Arca-Ruibal *et al.*, (2006), os fatores que interferem no resultado do teste para pinguins, ainda não estão tão esclarecidos quanto para outras espécies animais, o que pode ter sido um limitante em nosso estudo.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a detecção de GM, através do teste Platelia *Aspergillus* EIA (BioRad)® utilizando soro sanguíneo e LTB,

não demonstra ser uma boa ferramenta para diagnosticar aspergilose em pingüins-de- Magalhães naturalmente infectados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

LE LOC'H G, DEVILLE M, RISI E, *et al.* Evaluation of the serological test Platelia *Aspergillus* for the diagnosis of aspergillosis. **Proceedings of European Association of Avian Veterinarians**, 2005. p. 260–266.

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.

RICHARDSON, M. D; WARNOCK, D.W. **Fungal Infection Diagnosis and Management 3th edition**, Victoria: Blackwell Publishing, 2003.

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

TELL LA. Aspergillosis in mammals and birds: Impact on veterinary medicine. **Medical Mycology**. Oxford, 43: 71-73, 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.