

## INTERFERÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR CONÍDIOS DE *Aspergillus* (SEÇÃO FUMIGATI) NO DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSE ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOLÓGICO COMERCIAL

ÂNGELA LEITZKE CABANA<sup>1</sup>; GABRIEL BARACY KLAFKE<sup>2</sup>; ALESSANDRA JACOMELLI TELES<sup>3</sup>; JOSIARA FURTADO MENDES REDU<sup>3</sup>; MELISSA ORZECOWSKI XAVIER<sup>2</sup>; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária – UFPEL – cabanangela@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Micologia – Faculdade de Medicina – FURG – gabrielklafke@yahoo.com.br; melissaxavier@ig.com.br

<sup>3</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária – UFPEL – ale.teles@gmail.com; josiara.mds@hotmail.com

<sup>4</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária – UFPEL – meireles@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A aspergilose invasiva (AI) é uma doença de caráter oportunístico causada por fungos do gênero *Aspergillus* (seção Fumigati). Seu diagnóstico laboratorial é determinado a partir de amostras clínicas de fácil obtenção tais como soro sanguíneo, secreções e fragmentos de tecidos. No entanto, por se tratar de fungo de fácil disseminação, o diagnóstico de AI pode ser comprometido pela contaminação ambiental da amostra (MENEZES, 2008; XAVIER *et al*, 2011).

Técnicas diretas para detecção de galactomanana (GM), um antígeno polissacarídeo presente na parede celular de fungos do gênero *Aspergillus*, têm sido amplamente utilizadas para o diagnóstico de AI. Esse antígeno é liberado no momento do crescimento de hifas em processo de invasão tecidual, germinadas a partir de propágulos fúngicos, os conídios (KLONT *et al*, 2004; MAERTENS *et al*, 2007; XAVIER *et al*, 2011).

Nesse sentido, um dos testes atuais para diagnóstico de AI se baseia na detecção de GM a partir da técnica de ELISA sanduíche, devido a hidrossolubilidade desta molécula, o que a torna um marcador biológico eficiente. Porém vale ressaltar que, embora estes ensaios imunológicos apresentem alta sensibilidade podem sofrer inúmeras interferências (PAGANO *et al*, 2007; XAVIER *et al*, 2011).

Assim, para conhecimento da quantidade mínima de propágulos fúngicos de *Aspergillus* (seção Fumigati), capaz de interferir como contaminante ambiental em um teste imunológico é necessário determinar a concentração de propágulos detectáveis pelo teste, a fim de promover um correto diagnóstico a partir de ensaios imunológicos, como o ELISA (GM) sem a interferência ambiental.

Com isso e através do auxílio de técnicas micológicas e ópticas de quantificação o estudo objetivou detectar a concentração de conídios capaz de interferir no resultado de um teste imunológico comercial utilizado para diagnóstico de aspergilose invasiva.

### 2. METODOLOGIA

A padronização do inóculo de baixa concentração de *Aspergillus* (seção Fumigati) foi realizada a partir de três cepas oriundas da micoteca do Laboratório de Micologia-Faculdade de Medicina-FAMED-FURG (dois isolados clínicos- um

humano e um de animal silvestre (*Spheniscus magellanicus*), além de uma cepa padrão denominada AF 13703) que foram subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol (Sb+Cl) a 36°C/48h. Posteriormente, foram adicionadas as culturas 10 mL de solução salina estéril (0,85%) acrescida de 200µL de *Tween* 80 para obtenção dos propágulos fúngicos, adaptados do CLSI (2002) para fungos filamentosos. Após repouso de 30 minutos para decantação das partículas pesadas (fragmentos de hifas e cadeias de conídios), o sobrenadante foi alíquotado em tubos tipo *Falcon* para posterior alíquotagem e leitura espectrofotométrica.

O inóculo foi padronizado de acordo com a técnica espectrofotométrica, após filtração em gaze dupla estéril, a partir da D.O<sub>530</sub> (82-84% de transmitância). Após foi realizada diluição 1:50 em solução salina estéril (CLSI, 2002), até uma concentração de  $0,8 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-5}$  UFC/mL.

A quantidade de conídios foi determinada pela técnica de “*Pour Plate*”, utilizando quatro diluições seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ ). Uma alíquota de 100 µL foi semeada em duplicata por espalhamento, incubada a 36°C/48h para se determinar as unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) e confirmar padronização do inóculo. A partir desta etapa foi realizado um ensaio imunológico comercial com Platelia *Aspergillus* EIA® piloto utilizando as diferentes concentrações fúngicas obtidas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração mínima fúngica (CIM) capaz de ser detectada pelo ensaio imunológico comercial foi de 0,8 a 1 conídio/mL e a máxima de 1350 a 2400 conídios/mL. A contaminação ambiental pode ser um forte interferente já que apenas um conídio pode promover alteração do resultado gerando falsos positivos. As reações cruzadas com outras infecções fúngicas, uso concomitante de antibióticos de origem fúngica, mucosite ou ainda enfermidade do enxerto *versus* hospedeiro podem estar entre as causas de falso-positivos no Platelia® *Aspergillus* EIA, (TANRIOVER *et al*, 2005). Essa taxa de falso-positivos é relatada como variável de 8-14% (MENNINK-KERSTEN, DONNELLY, 2004; TANRIOVER *et al*, 2005; AQUINO, GOLDANI, PASQUALOTTO, 2007).

A contaminação ambiental é frequentemente citada como fator importante de interferência nos resultados do teste e possível causa de falso-positivos (XAVIER *et al*, 2011). Nesse sentido, torna-se extremamente necessário o conhecimento de fatores associados ao processo de armazenamento, coleta e transporte dessas amostras, para que os resultados falso-positivos sejam evitados, promovendo assim maior fidedignidade a interpretação dos resultados do ensaio imunológico.

Em outros estudos semelhantes, a contaminação ambiental é relatada com extrema relevância, uma vez que o tempo entre coleta e processamento laboratorial da amostra clínica pode superar 24h, considerando que *Aspergillus* (seção Fumigati) é um fungo ubíquo, frequentemente contaminante, com rápida velocidade de crescimento atingindo uma taxa de germinação de 36,5% em apenas 5,5 horas de incubação (ARAÚJO, RODRIGUES, 2004), sendo assim, seus metabolitos polissacarídeos tornam-se detectáveis pelo teste imunológico, alterando os resultados do mesmo, conforme também observado em nosso estudo parcial.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam a necessidade de um rígido controle desde a coleta, transporte, armazenamento e processamento das amostras, evitando assim interferência nos resultados de testes imunológicos, uma vez que uma quantidade mínima de conídios (0,8-1 conidio/mL) pode gerar hifas produtoras de quantidades de GM detectáveis no ensaio imunológico como positivo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO VR, GOLDANI LZ, PASQUALOTTO AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Mycopathologia** 163:191-202, 2007.

ARAÚJO R, RODRIGUES A.G. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. **J. Clin. Microbiol.** 42(9): 4535-4537, 2004

CLSI. Método de Referência para testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Fungos Filamentosos à Terapia Antifúngica: **Documento M38-A2**. 2ªed. 2002

KLONT RR, MENNINK-KERSTEN M, VERWEIJ PE. Utility of *Aspergillus* Antigen Detection in Specimens Other than Serum Specimens **Clin. Infect. Dis.** 39:1467-1474, 2004.

MAERTENS JA, KLONT R, MASSON C. et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. **Clin. Infect. Dis.** 44:1329-1336, 2007.

MENEZES, A. 2008. Técnicas de contagem *pour plate* e *spread plate*. Rio de Janeiro. CEFET-RJ. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/relatorio-tecnicas-de-contagem-pour-plate-e-spread-plate-doc-doc-a7854.html>. Acesso em 15 Jul 2014.

MENNINK-KERSTEN M, DONNELLY J, VERWEIJ P. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. **Lancet Infect. Dis.** 4:349-357. 2004.

PAGANO, L. et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study – Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. **Clin. Infect. Dis.** 45:1161-1170. 2007.

TANRIOVER MD, METAN G, ALTUN B, HASCELIK G, UZUN O. False positivity for *Aspergillus* antigenemia related to the administration of piperacillin/tazobactam. **Eur. J. Int. Med.** 16: 489-491, 2005.

XAVIER MO, AQUINO VR, SEVERO LC, PASQUALOTTO AC. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. **Rev. Bras. Oncol. Clín.** 7:41-50, 2011