

Detecção de Galactomanana em pacientes transplantados de células hematopoiéticas.

Milton CAMPLESI Junior¹, Maria do Rosário Rodrigues SILVA¹; Hildene Meneses SILVA¹; Carolina Rodrigues COSTA¹; Murilo Santos SILVA¹; Adriano ARANTES Moraes²

1 - Instituto de patologia Tropical e Saúde Pública/UFG-Goiânia-Goiás Email: camplesijr@yahoo.com.br

2 - Hospital Araújo Jorge- Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Serviço de Transplante de Medula Óssea.

Palavras-chave: Galactomanana, Transplantados de células hematopoiéticas

INTRODUÇÃO

A epidemiologia da Aspergilose invasiva (AI) é considerada complexa, pois os fungos agentes da infecção são normalmente existentes em todo ambiente, sendo que o ar, os tecidos de algodão podem constituir fontes de transmissão da doença (Kontoyiannis e Bodey, 2002, Alonso *et al.* 2006). Em pacientes transplantados de medula óssea observa-se com frequência casos de AI, que podem ser a causa de morte destes indivíduos (Kontoyiannis e Bodey, 2002; Ohmagari *et al.* 2004).

O diagnóstico de AI é a maioria das vezes, tardio fazendo com que o tratamento não seja instituído e assim diminuindo a sua eficácia, o que faz com que a doença seja letal. Além de sintomatologia inespecífica, exames radiográficos do tórax podem demonstrar infiltrações localizadas que, no entanto não se prestam para diagnóstico definitivo (Kontoyiannis e Bodey, 2002). Embora a bronqueoscopia com biópsia transbronquial ou lavagem bronqueoalveolar possam fornecer material para cultura ou amostras histológicas do microrganismo são procedimentos invasivos sendo de risco para pacientes debilitados e neutropênicos (Wingard, 1999). A implementação de técnicas de alta resolução como a tomografia computadorizada, a detecção de DNA de *Aspergillus* spp, por métodos como reação de polimerase em cadeia (PCR) e a detecção de antígenos do fungo usando o sangue têm sido úteis para a detecção precoce da AI, constituindo técnicas promissoras de diagnóstico (Verweij e Meis, 2000; Kami *et al.* 2001).

Métodos viáveis não-invasivos na detecção de galactomanana (GM), antígeno presente no soro e outros fluidos biológicos, usando a técnica de ELISA são de

grande valor no diagnóstico de AI (Becker *et al.* 2000; Maertens *et al.* 2001). Desta forma, em pacientes que apresentam fatores de risco para AI como longo tempo de neutropenia ou que tenham sido submetidos a transplantes, a detecção deste antígeno pode servir para um possível diagnóstico da infecção.

Neste trabalho, cultivos de sangue e detecção de galactomanana no soro de pacientes transplantados de medula óssea, foram realizados visando verificar o valor de GM como possível técnica para o diagnóstico desta infecção, comparando-a com os resultados obtidos em cultivo.

MÉTODOS

Amostra clínicas e pacientes

Este trabalho foi realizado com 61 pacientes procedentes do Hospital Araújo Jorge em Goiânia – GO que foram submetidos ao transplante de medula óssea. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG do Hospital Araújo Jorge, conforme protocolo número 055/08. O material (sangue) do paciente com suspeita clínica de AI foi encaminhado pelo Centro de Transplante de Medula Óssea para o laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, durante o período de junho de 2010 a maio de 2011.

O sangue (periférico e cateter) para a análise foi colhido em tubos a vácuo, sendo que para o cultivo de fungos foi utilizados tubos com anticoagulante EDTA e para teste de ELISA, tubos sem anticoagulante.

Isolamento do fungo

O sangue coletado foi semeado (± 2 ml) em tubos de ensaio contendo 50 ml de meio BHI bifásico, composto por uma fase sólida e uma fase líquida. Os frascos foram incubados a 37°C e a temperatura ambiente, examinados e agitados a cada 24 horas, e diariamente e observando o crescimento do microrganismo no meio sólido foi feito o isolamento através da transferidos para tubos de ensaio contendo ágar BHI, para posterior identificação (Telles Filho, 1997).

A identificação dos fungos filamentosos foi realizada pelas características macroscópicas e microscópicas das colônias nos meios de ágar BHI e batata dextrose. Microcultivo em ágar batata foi realizado quando não era possível a identificação pela microscopia da colônia.

Teste de Detecção de GM

As amostras foram colhidas em diferentes dias (de 4 em 4 dias), até apresentarem resultados duplos compatíveis, ou seja, duas amostras sequenciais positivas ou negativas. A detecção de GM usando-se o kit Platelia Aspergillus EIA, Laboratório Bio-Rad, Marnes, França foi realizada segundo as instruções do fabricante. A leitura do teste foi realizada pela medida de densidade óptica (DO), sendo que valores de DO > 0,5 foram considerados como positivos.

RESULTADOS

Dentre os 61 pacientes analisados, foram realizados em determinados casos até 10 coletas de um mesmo paciente, totalizando 175 amostras clínicas.

Em amostras do sangue periférico e/ou cateter dos 61 pacientes verificou-se o crescimento de 11 isolados de *Aspergillus*, os quais foram identificados em *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. versicolor*. O número de isolados de cada espécie e a porcentagem equivalente encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Identificação das espécies de *Aspergillus* spp o número e a porcentagem de isolados encontrados em 61 pacientes

	n	%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	05	8,2
<i>Aspergillus flavus</i>	04	6,5
<i>Aspergillus versicolor</i>	02	3,3
Total	11	18,0

Das 175 amostras analisadas para a detecção de GM, verificou-se positividade em 82 delas, sendo que estas se referiam a 21 pacientes que se mostraram com valores de DO >0,5 em diferentes amostras. GM foi encontrada em duas amostras sequenciais para estabelecer um diagnóstico de aspergilose, mas nos quais os fungos foram isolados do sangue em apenas 10 conforme mostrado na tabela 1.

DISCUSSÃO

A prevalência de infecção por fungos em pacientes transplantados de medula tem aumentado muito, sendo que as espécies de *Aspergillus* são os principais agentes etiológicos, representando cerca de 5 a 20% dos casos (Singh *et al*, 2003). O isolamento de *Aspergillus* em 11 pacientes de 82 estudados em nosso trabalho

(13,4%) representa um percentual elevado, pois o índice de mortalidade entre os pacientes de transplantes que apresentam-se com aspergilose invasiva é de aproximadamente 60-90% (Hardak *et al*, 2009).

Apesar do isolamento do fungo ser considerado um bom método de diagnóstico, técnicas sorológicas que são mais rápidas podem ser importantes para iniciar o tratamento e assim reduzir a mortalidade.

Entre os testes que envolvem técnicas sorológicas, o de ELISA, sanduíche duplo (Platelia; Bio-Rad), que é capaz de detectar galactomanana, o principal constituinte da parede celular é considerado de alta especificidade (Castagnola *et al*, 2010). Nossos resultados mostraram um percentual de 25,6% de positividade, portanto maior do que o encontrado pelo isolamento do fungo. Marr *et al*. (2004) verificaram que, para AI comprovada em receptores de transplante de células hematopoéticas, a sensibilidade do ensaio Platelia variou de 87,5 naqueles pacientes que não receberam terapia antifúngica a 20% nos pacientes que receberam terapia antifúngica. Costa *et al*. (2002) verificaram que ELISA de detecção de GM no soro foi superior a um ensaio de PCR-Light Cycler no diagnóstico de aspergilose invasiva.

CONCLUSÕES

A detecção de GM em pacientes transplantados de medula óssea pode representar um excelente método adicional para diagnóstico precoce de AI, podendo de tal forma reduzir a morte destes pacientes.

REFERÊNCIAS

- Alonso MAS, Ramos IJ, Lletí MS, Pema'n J 2006. Epidemiology of invasive fungal infections due to *Aspergillus* spp. and Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect* 12:2-6.
- Becker, M. J., S. de Marie, D. Willemse, H. A. Verbrugh, and I. A. Bakker-Woudenberg. 2000. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J. Clin. Microbiol.* 38:1434–1438.
- Castagnola E, Furfaro E, Caviglia I, Licciardello, Faraci M, Fioredda F, Toma P. Bandettini R, Machetti M and Viscoli C. 2010. Performance of the galactomannan antigen detection test in the diagnosis of invasive aspergillosis in children with cancer or undergoing haemopoietic stem cell transplantation. *Clinical Microbiology and Infection*; 16: 1197-1203.

Costa, C., J. M. Costa, C. Desterke, F. Botterel, C. Cordonnier, and S. Bretagne. 2002. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 40:2224–2227.

Hardak E, Yigla M, Avivi I, Fruchter O, Sprecher H and Oren I. 2009. Impact of PCR-based diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis on clinical outcome. *Bone Marrow Transplantation*; 44: 595-599.

Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori S-I, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H 2001. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 33:1504-1512.

Kontoyiannis DP, Bodey GP 2002. Invasive Aspergillosis in 2002: Na Update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:161-172.

Maertens, J., J. Verhaegen, K. Lagrou, J. Van Eldere, and M. Boogaerts. 2001. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* 97:1604–1610.

Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004; 190:641–9.

Ohmagari N, Raad II, Hachem R, Kontoyiannis DP 2004. Invasive Aspergillosis in Patients with Solid Tumors. *Cancer* 101:2300-2302.

Paterson DL. Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:44–69.

Singh N, Husain S. 2003. Aspergillus infections after lung transplantation: clinical differences in type of transplant and implications for management. *J Heart Lung Transplant.* 22: 258-266.

Telles Filho FQ 1997. Infecções causadas por fungos. In: Rodrigues EAC. Infecções Hospitalares. Prevenção e Controle. Sarvier. 6:639-40.

Verweij PE, Meis JF 2000. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transp Infect Dis* 2:80-87.

Wingard JR 1999. Opportunistic infections after blood and marrow transplantation. *Transpl Infect Dis* 1:3–20.