

## MONITORAMENTO SOROLÓGICO PARA DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSE EM PINGUINS: AVALIAÇÃO DA PRECOCIDADE E EFICÁCIA DO TESTE DE IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (IDGA)

**ÂNGELA LEITZKE CABANA<sup>1</sup>; MELISSA ORZECOWSKI XAVIER<sup>2</sup>; RODOLFO PINHO DA SILVA FILHO<sup>3</sup>; PAULA LIMA CANABARRO<sup>3</sup>; RENATA OSÓRIO DE FARIA<sup>4</sup>; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Universidade federal de Pelotas- [cabanangela@gmail.com](mailto:cabanangela@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade federal de Rio Grande

<sup>3</sup> Centro de recuperação de animais marinhos

<sup>4</sup> Universidade federal de Pelotas – [meireles@ufpel.tche.br](mailto:meireles@ufpel.tche.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A aspergilose é doença infecciosa causada por fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente *A. fumigatus* (XAVIER et al., 2008). Ela representa uma das principais causas de mortalidade em pinguins em cativeiro (ABUNDIS SANTAMARIA, 2003, TELL, 2005, XAVIER, 2007).

O diagnóstico definitivo é difícil, pois os sinais clínicos, como dispneia, regurgitação, apatia e alterações em exames de imagem que demonstram opacidade de sacos aéreos, são inespecíficos e ocorrem tardiamente. Do mesmo modo, a inespecificidade das alterações sanguíneas, de neutrofilia e eosinofilia não são conclusivas se analisadas isoladamente (DIEBOLD; BRANCH; HENRY, 1999). Em adição, os exames micológicos clássicos, tais como exame direto e cultivo micológico, apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Assim, o prognóstico da doença é desfavorável; a maioria dos casos culmina em óbito, com confirmação através de exames post-mortem (XAVIER et al., 2008).

Considerando que a precocidade do diagnóstico *in vivo* da aspergilose está diretamente relacionada com a eficácia terapêutica, o trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia e a precocidade da detecção de anticorpos anti-*Aspergillus fumigatus* por monitoramento sorológico no diagnóstico de aspergilose em pinguins em cativeiro.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre junho/2009 e dezembro/2011, avaliando pinguins-de-Magalhães em reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos/CRAM/FURG, tendo aprovação do comitê de ética da UFPel (nº 6919) e termo de consentimento livre e esclarecido dos participantes.

Os animais foram submetidos a coletas de sangue periférico (veia jugular), na chegada ao centro e durante o período de cativeiro até seu destino (veia média

metatarsal). As amostras foram centrifugadas e o soro foi aliquoteado e congelado a -20°C para posterior análise. Animais com permanência inferior a 30 dias e com apenas uma amostra sérica coletada foram excluídos do estudo.

Foi realizado monitoramento sorológico semanal para detecção de anticorpos anti-*A. fumigatus* a partir da técnica de IDGA (Imunodifusão radial dupla em gel de ágar), utilizando antígeno e soro controle positivo comerciais (*Aspergillus fumigatus* ID antigen IMMY® e *Aspergillus fumigatus* ID control IMMY®). Foram consideradas positivas as amostras onde observou-se linha de precipitação antígeno-anticorpo contígua a linha do soro controle (linha de identidade).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos 239 pinguins-de-Magalhães recebidos no CRAM nesse período, 105 foram excluídos, 64 por menos de 30 dias de permanência e 41 por apenas uma coleta sérica, totalizando 134 animais estudados.

Dentre 134 animais incluídos, 33 vieram a óbito por aspergilose: 31 (93,9%) por *A. fumigatus* e dois (6,1%) por *A. flavus*, quatro por outras causas, e 97 animais foram reabilitados e liberados ao seu habitat.

Nenhum pinguim apresentou IDGA positiva na chegada ao CRAM. Mas durante monitoramento sorológico, a presença de anticorpos anti-*A. fumigatus* foi detectada através da IDGA em 27 animais: 22 morreram por aspergilose e os outros cinco foram liberados entre um a 24 dias da IDGA positiva, não apresentando sinais clínicos. Dos 108 animais que não tiveram amostra positiva na IDGA, 11 vieram a óbito por aspergilose. Estes dados resultaram em taxas de 81% de sensibilidade, 89% de especificidade, 66% de VPP (valor preditivo positivo) e 95% de VPN (valor preditivo negativo).

Os principais sinais clínicos observados nos animais que desenvolveram aspergilose foram dispnéia, apatia e regurgitação, sendo evidenciados em média 34 dias (variando de seis a 183 dias) após IDGA positiva, culminando com óbito em poucos dias.

Embora a sorologia seja descrita como um método diagnóstico da aspergilose em pinguins e demais espécies, existem apenas referências quanto a técnica de ELISA (TELL, 2005; REDIG, 1993; GRACZYK et al., 1998), que, apesar da maior sensibilidade, é mais complexa em sua operacionalização, ao contrário da IDGA. Entretanto, não há estudos descrevendo taxas de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da IDGA para diagnóstico de aspergilose em aves.

A sensibilidade e especificidade superior a 80% da IDGA, encontradas neste estudo, são similares às descritas para outras espécies, como caninos (SHARP et al., 1984) e humanos (BABATASI et al., 2000; CAMELI-ROJAS et al., 2004), nas quais esta técnica pode ser considerada como padrão-ouro para diagnóstico. Os resultados falso-negativos na IDGA em 11 pinguins que vieram a óbito por aspergilose podem ser decorrentes da incapacidade de produzir grande quantidade de anticorpos necessária para positivar o teste (GRACKZYK et al., 1998; LATGÉ, 1999). Contudo, a eficácia do teste ainda demonstrou VPN de 95%.

Acerca dos cinco animais com IDGA positiva e sem confirmação diagnóstica de aspergilose, sugere-se que foram infectados e conseguiram debelar o agente fúngico. Todos foram liberados ao seu habitat natural em menos de 34 dias, tempo médio encontrado no estudo entre sorologia positiva e início dos sinais clínicos. Este período de tempo encontrado indica boa precocidade diagnóstica deste teste,

caracterizando como ponto crucial para eficácia terapêutica e melhor prognóstico (GRACKZYK et al., 1998; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; REDIG, 1993).

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o monitoramento sorológico, através de IDGA, é útil para detecção precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro, podendo ser implementado na rotina, reduzindo a mortalidade em decorrência da infecção por *Aspergillus* spp e auxiliar na efetividade do tratamento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUNDIS- SANTAMARIA, E. **Aspergillosis in birds of prey**. Disponível em [www.aspergillus.man.ac.uk](http://www.aspergillus.man.ac.uk). 2003. Consulta em: abril de 2012.

BABATASI et al. Surgical treatment of pulmonary aspergilloma: current outcome. **J Thorac Cardiovasc Surg**;119: 906-12, 2000.

CAMELI-ROJAS, V; MATA-ESSAYAG, S; DE CAPRILES, CH; MAGALDI, S; DE PEREZ, EG; GARRIDO, L; BALDERRAMA-CABALLERO, D. *Aspergillus* species in patients with chronic rinosinusitis. **Mycoses** 47, 47–49, 2004.

DIEBOLD, EN; BRANCH, S; HENRY, L. Management of penguin population in North American zoos and aquariums. **Marine Ornithology**, v.27, p.171-176, 1999.

GRACZYK, TL; CRANFIELD, MR; KLEIN, PN. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive Aspergillosis. **Mycophatologia**, v.140, p.121-127, 1998.

LATGÉ, JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin.Microbiol. Rev.** v.12, n.2, p.310-350, 1999.

REDIG, PT. General Infectious Diseases-Avian Aspergillosis. In: **FOWLER, M.E.: Zoo & Wild Animal Medicine: current therapy 3**. Denver, Colorado: WB Saunders Inc. P.178-181, 1993.

SHARP, NJH; BURRELL, MH; SULLIVAN, M. et al. Canine nasal aspergillosis: serology and treatment with ketoconazole. **J. Small Anim. Pract.**; 25:149-158, 1984.

TELL, LA. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology Supplement 1**, 43, S71/S73, 2005.

XAVIER, MO. **Aspergilose em Pinguins em Cativeiro: Diagnóstico, Prevenção e Controle em Centro de Recuperação e Animais Marinhos**. 92f., 2007. Dissertação (mestrado em ciências – área de conhecimento: Sanidade Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

XAVIER, MO. **Aplicações e limitações do método de detecção do antígeno galactomanana para o diagnóstico de aspergilose.** 104f., 2008a Tese (doutorado em ciências pneumológicas- área de conhecimento: Ciências pneumológicas- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.