

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Avaliação do teste platelia EIA® *Aspergillus* para diagnóstico da aspergilose
em pinguins e interferência da contaminação ambiental**

Ângela Leitzke Cabana

Pelotas, 2017

Ângela Leitzke Cabana

Avaliação do teste platelia EIA® *Aspergillus* para diagnóstico da aspergilose em pinguins e interferência da contaminação ambiental

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C111a Cabana, Ângela Leitzke

Avaliação do teste platelia EIA® *Aspergillus* para diagnóstico da aspergilose em pinguins e interferência da contaminação ambiental / Ângela Leitzke Cabana ; Mário Carlos Araújo Meireles, orientador ; Melissa Orzechowski Xavier, coorientadora. — Pelotas, 2017.

65 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Galactommanan. 3. ELISA sanduiche. 4. Conídios. I. Meireles, Mário Carlos Araújo, orient. II. Xavier, Melissa Orzechowski, coorient. III. Título.

CDD : 636.5089

Ângela Leitzke Cabana

Avaliação do teste platelia EIA® *Aspergillus* para diagnóstico da aspergilose em pinguins e interferência da contaminação ambiental

Requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 09/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)
Doutor em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto
Doutor em Ciências Pneumológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M.V Dr^a. Ana Paula Neuschrack Albano
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho final (tese) a minha família, em especial a minha mãe Nésia Terezinha e meu irmão André, alicerces da minha trajetória. Dedico também ao Pedro Humberto, aquele que divide comigo alegrias, neuroses e tristezas, aos Médicos Veterinários que assim como eu são apaixonados pela profissão e finalizando a todos os amigos (as) que permaneceram ao meu lado neste momento de muitas abdições e também de conquistas. Todos vocês são PARTE ESSENCIAL do quebra-cabeças da minha transformação.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta tese fosse realizada. Não sendo viável nomeá-los a todos, há no entanto, alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero (de forma bem extensa e intensa- como eu me considero).

Tive a honra de ter sido orientada pelo **Prof. Doutor Mário Carlos Araújo Meireles**, a quem agradeço todo o esforço, dedicação e estímulo constante. Ser professor não é só questão de possuir um corpo de conhecimentos e a capacidade de controle de aula. Para ser professor é preciso igualmente capacidade de estabelecer relações humanas com as pessoas a quem ensina e isto o Prof. Mário tira de letra.

Gostaria de agradecer igualmente a minha coorientadora **Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier**, a quem sempre tive admiração pelo rigor e a capacidade científica que tem e que foram para mim um processo de aprendizagem e um exemplo de profissionalismo e de vida a ser seguido.

Aprender é um processo social e humano árduo, o mesmo se pode dizer de ensinar. Ensinar implica, simultaneamente, em ter emoções e razões para. Estes dois professores foram pilares para meu processo de ensino-aprendizagem e desempenharam seus papéis com maestria.

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Micologia Veterinária/Micvet que me acolheu e contribuiu para minha formação acadêmica, formação de recursos humanos, formação profissional, formação de amigos e de uma família. Permaneci neste grupo de pesquisa por cerca de 10 anos (do início da graduação em 2006 até o fim do doutorado em 2017) e não tenho como não me sentir parte dessa história, espero que todas essas oportunidades e conhecimentos adquiridos permaneçam vivos minha memória (rodas de chimarrão, reuniões, discussões, viagens para congressos, experimentos dos mais variados, artigos, fluxo, autoclave, aulas práticas, ensinamento de estagiários, visitas a sala do “chefe” e as tão esperadas confraternizações pós defesas)- somos conhecidas como as “gurias do Prof. Mário”

que fazem um barulhão no corredor, mas que também produzem. Toda minha jornada acadêmica é dedicada também a vocês, miscigenação de perfis, que mesmo com todas as diferenças fazemos a diferença. Aqui deixo escrito os nomes das que permanecem atualmente, mas guardo todas em meu coração e pra vida! Sucesso gurias: Prof. Renata Osório de Faria, Josiara, Otávia, Caroline, Anna Luiza, Emanoele, Stefanie, Luiza, Angelita, estagiários (as) e bolsistas em geral. Meu muito obrigada!

Aos funcionários, alunos, professores, técnicos, animais, os quais mantive contato durante esses anos que se desenrolaram na jornada acadêmica e os quais tive oportunidade de junto aprender ou ensinar algo. Meu muito obrigada!

Agradeço aos grupos de pesquisa e trabalho adjacentes e muito importantes nessa caminhada, como o Centro de Recuperação de Animais Marinhos/CRAM FURG- especialmente na pessoa do Médico Veterinário, entusiasta dessa caminhada e amigo **Rodolfo Pinho da Silva Filho** e da Bióloga e amiga **Aryse Moreira Martins** e ao Laboratório de Micologia/FAMED-FURG na pessoa do técnico capacitado que é, amigo e sempre disposto Biomédico **Gabriel Baracy Klafke**, além de todos os seus membros que tive contato e amizades que tive o privilégio de construir ao longo desses anos, as oportunidades e portas abertas que sempre estiveram a minha disposição para que esta tese fosse concluída levarei comigo para sempre, para vida.

Algum autor já disse que gratidão é a lembrança do coração e essa afirmativa faz muito sentido. Ao longo de nossas vidas sempre aparecem anjos da guarda que nos ajudam, e sem os quais nossos objetivos seriam difíceis de alcançar ou seriam inatingíveis. Por isso que esta parte da tese é tão especial e não poderia aqui deixar de agradecer aos amigos (que fiz ao longo dessa jornada acadêmica, os antigos que permaneceram, os novos que vieram, os distantes, mas sempre presentes e aqueles que retomaram e reforçaram o contato diário nesse período, além dos de infância é claro que se fizeram sempre presentes) - vou falar um pouquinho de cada um:

Josiara Furtado Mendes Redú, só podia seres tu a primeira, amiga de infância, confidente e sempre presente (na vida, nos almoços com marmita, nos cafés e nas conversas), companheira de estrada e experimento (mesmo que levantando as 6hs da manhã e houvessem repetições quando deu errado), nem preciso falar mais nada sobre o nosso laço de amizade. **Otávia de Almeida Martins**, amiga que fiz no Micvet, mas que parece ser de longa data, sempre disposta (pra

escutar, pra orientar, pra fazer compras e pra se divertir de inúmeras formas) a e parceira pra qualquer hora, espero que mesmo nossos encontros diários não acontecendo mais, nossa amizade continue a florescer, assim como a gente se chama - “Flor do dia”.

Caroline Lunkes dos Santos, amiga que fiz no Micvet também, mas que este destino já estava traçado a um tempo, Deus sabe o que faz “juvenil” e uniu nossos caminhos, espero que fiquem pra vida toda. **Alessandra Jacomelli Teles**, amiga que também é da safra Micvet e que permaneceu, meiga e também sempre disposta, inclusive pra estrada Rio Grande-Pelotas, café e compra de camarões no intervalo dos experimentos.

Bruna Zafalon da Silva e **Marcela Elisa Pearson**, amigas hoje de Porto Alegre/RS, mas que a profissão de Médica Veterinária me trouxe e esse destino é muito sábio, vai manter a gente pra sempre perto, porque vocês são essenciais e especiais.

Alessandra Krolow Voigt e Família, amiga que formei lá na graduação e que é irmã de fé, me lembrou durante esse período do doutorado de não esquecer que sou Médica Veterinária, sempre disposta para qualquer coisa, inclusive ajudar na formatação desta tese e de outros trabalhos, além daqueles bons e regados cafés nos intervalos que nos sobravam. **Antonella de Souza Mattei**, amiga da safra antiga do Micvet (porque sim, eu sou dessa época de quase 10 anos atrás), parceira, confidente e sempre disposta a dar conselhos acadêmicos, bem como escutar as minhas reclamações e preocupações, também foi passageira no expresso Rio Grande-Pelotas.

Ana Paula Neuschrack Albano e **Greici Maia Behling**, amigas que fiz desde o mestrado e que são exemplos de profissionais e companheirismo, vocês não poderiam faltar aqui pois são os pilares da medicina da conservação e dos animais silvestres que me motivaram a chegar até aqui.

Aos demais amigos (as), família e agregados, que aqui não citei nomes (é que o espaço é reduzido e eu sempre passo ele) saibam que embora eu estivesse ausente fisicamente nesses últimos anos, eu sempre estive presente em pensamento (quem me conhece bem sabe, sou virginiana) e prometo recompensar ao longo do tempo toda abdicação que foi necessária para que este trabalho e este sonho se concluísse.

Mais no fim, mas no local mais especial deste espaço de papel. Agradeço e dedico esta tese a instituição que é a base da minha vida e das minhas conquistas: a minha Família. Em especial a minha mãe **Nésia Terezinha da Paz Leitzke** e meu irmão e pai **André Leitzke Cabana**, agradeço pela coragem, carinho, dedicação, ombro amigo, afago necessário e a forma positiva de enfrentar os percalços da vida, pois estes foram incentivos determinantes para eu chegar até aqui.

Ao meu sempre namorado e companheiro de todas as horas **Pedro Humberto da Silva Casalinho**, ouvinte atento de algumas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pelo apoio, pela confiança e pela valorização sempre tão entusiasta no meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem para ultrapassar a culpa pelo tempo que a cada dia lhe subtraía e o mau humor que a pressão e os prazos traziam consigo.

Finalmente gostaria de agradecer a **Deus** pelo dom da vida, força, persistência e coragem para toca-la pra frente e a todas as pessoas que torceram ou intercederam por mim, mesmo que de forma anônima ou discreta. Tive perdas e tive ganhos nesse período, mas com certeza tive **Sucesso, Força, Foco e Fé. Gratidão!**

E como disseram dois pensantes:

“Você não faz amigos, você os reconhece” - Vinicius de Moraes.

“Só há um tempo em que é fundamental despertar, e esse tempo é agora” - Buda.

Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo- é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas é mais preciso ainda

Antoine de Saint Exupér

Resumo

CABANA, Ângela Leitzke. **Avaliação do teste Platelia EIA® *Aspergillus* para diagnóstico da aspergilose em pinguins e interferência da contaminação ambiental.** 2017. 65f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A aspergilose é uma doença infecciosa não contagiosa causada por fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente aqueles pertencentes à seção Fumigati e já foi descrita em diversas espécies, dentre elas os pinguins. As altas taxas de mortalidade atribuídas a esta doença, são decorrentes especialmente da dificuldade de realização de um diagnóstico precoce. Técnicas diagnósticas diretas para detecção do antígeno fúngico galactomanana (GM) em amostras clínicas têm sido utilizadas de modo crescente para o diagnóstico de aspergilose invasiva (AI) em humanos. A GM constitui-se de um polissacarídeo presente na parede celular de fungos do gênero *Aspergillus*. Embora sua aplicabilidade já esteja estabelecida para o diagnóstico precoce da AI em humanos, uma única testagem sérica por ELISA sanduíche a partir do kit comercial Platelia® *Aspergillus* EIA, deve ser interpretada com cautela, pois a técnica apresenta algumas limitações. Em animais sua aplicabilidade ainda não é bem elucidada. Com isso, o estudo objetivou avaliar a eficácia do teste Platelia EIA® *Aspergillus* para diagnóstico da aspergilose em pinguins e a influência da contaminação ambiental nos resultados do mesmo. Foram incluídas no estudo diagnóstico, amostras séricas de 29 pinguins de Magalhães que vieram a óbito por aspergilose (grupo caso) e 23 hígidos (grupo controle), as quais foram testadas a partir do kit para ensaio imunoenzimático tipo sanduíche em microplaca (Platelia *Aspergillus* EIA®, Bio-Rad) conforme as instruções do fabricante. Para o experimento de interferência ambiental foram utilizados 12 isolados de *A. fumigatus* da micoteca do Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da FURG/FAMED incluindo cepas padrão, isolados clínicos de pinguins, humanos e isolados ambientais. Foram utilizadas para padronização do inóculo etapa de filtração, sedimentação, *Pour-plate* e espectrofotometria de acordo com CLSI, 2008. A detecção de GM foi realizada em três diluições sucessivas dos inoculos seguindo instruções do fabricante. Ao final foi calculado o índice de GM dividindo o valor da média da DO da duplicata da amostra (clínica ou da cepa testada) pelo valor da média da DO da duplicata da amostra de *cut-off* fornecida pelo kit. O índice de GM sérica não diferiu entre os animais do grupo caso e controle ($p_{KW}=0,097$). A partir dos valores determinados pelas coordenadas da curva ROC, quatro diferentes pontos de corte (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0) foram analisados, resultando em taxas de sensibilidade variando de 86,2% a 34,5%, e de especificidade entre 87% e 26,1%. Já na avaliação da interferência ambiental, a menor concentração de propágulos fúngicos de *Aspergillus fumigatus* capaz de gerar um resultado positivo foi de 480 conídios, sendo a concentração mediana de $4,8 \times 10^3$. Conclui-se que a

detecção sérica de GM pelo teste Platelia *Aspergillus* EIA® não parece ser útil para o diagnóstico da aspergilose em pinguins naturalmente infectados, resultando em muitos falso-positivos. E, em relação a quantidade de conídios de *A. fumigatus* necessária para determinar resultado falso-positivo no teste de detecção de GM, evidenciou-se que há necessidade de uma maciça contaminação ambiental, por no mínimo 500 conídios, para que haja interferência no Platelia *Aspergillus* EIA®.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; galactomanana; ELISA sanduíche; conídios.

Abstract

CABANA, Ângela Leitzke. **Evaluation of the EIA® *Aspergillus platelia* test for the diagnosis of aspergillosis in penguins and interference of environmental contamination.** 2017. 65f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Aspergillosis is a non-contagious infectious disease caused by fungi of the genus *Aspergillus*, especially those belonging to the Fumigati section and has been describe in several species, among them penguins. The high mortality rates attributed to this disease are due in particular to the difficulty of performing an early diagnosis. Direct diagnostic techniques for the detection of galactomannan (GM) fungal antigen in clinical samples have been increase used for the diagnosis of invasive aspergillosis (AI) in humans. GM is a polysaccharide present in the cell wall of fungi of the genus *Aspergillus*. Although its applicability from the demonstration of circulating GM kinetics is already establish for the early diagnosis of AI in humans, a single serum test by Platelia® *Aspergillus* EIA should be interpreted with caution, since the technique has some limitations. In animals, its applicability is still not well understand. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the Platelia EIA® *Aspergillus* test for the diagnosis of aspergillosis in penguins and the influence of environmental contamination on the results. Serological samples of 29 Magellanic penguins that died of aspergillosis (case group) and 23 healthy (control group) were included in the diagnostic study, which were tested from the micro plate sandwich immunoenzymatic assay kit (Platelia *Aspergillus* EIA ®, Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. For the environmental interference experiment, 12 isolates of *A. fumigatus* from the mycology laboratory of the FURG / FAMED School of Medicine including standard strains, clinical isolates of penguins, humans and environmental isolates were use. The filtration, sedimentation, Pour-plate and spectrophotometry steps was use to standardize the inoculum according to CLSI, 2008. GM detection was perform on three successive dilutions of the inoculums following the manufacturer's instructions. At the end, the GM index was calculated by dividing the mean OD value of the sample duplicate (clinical or strain tested) by the mean OD value of the duplicate cut-off sample provided by the kit. The serum GM index did not differ between the animals in the control and the case group (pKW = 0.097). From the values determined by the coordinates of the ROC curve, four different cutoff points (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0) were analyzed, resulting in sensitivity rates ranging from 86.2% to 34, 5%, and specificity between 87% and 26.1%. In the evaluation of environmental interference, the lowest concentration of fungal propagates of *Aspergillus fumigatus* capable of generating a positive result was 480 conidia, with a median concentration of 4.8×10^3 . It is conclude that the serum detection of GM by the Platelia *Aspergillus* EIA® test does not seem to be useful for the diagnosis of aspergillosis in naturally infected penguins, resulting in many false

positives. And, in relation to the amount of *A. fumigatus* conidia required to determine false-positive results in the GM detection test for AI diagnosis, it was shown that the degree of environmental contamination capable of causing interference in the Platelia *Aspergillus* EIA® test Be robust, of about 500 conidia.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; galactomannan; ELISA sandwich; conidia.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Serum GM indices in healthy penguins (0) and aspergillosis (1)....	53
Figura 2 -	ROC curve of serum GM detection to diagnosis of aspergillosis in penguins.....	53
Figura 3 -	Lowest conidial concentration of <i>A. fumigatus</i> responsible for positive results (GM index > 0.5) in Platelia® Aspergillus EIA according to their origin (n=12) (S: standard strains; P: strains from aspergillosis in penguins; H: strains from human.....	59
Figura 4 -	GM index according to the lowest conidial concentration of <i>A. fumigatus</i> responsible for positive results in Platelia® Aspergillus EIA (n=12) (S: standard strains; P: strains from aspergillosis in penguins; H: strains from human aspergillosis.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of serum GM detection in the diagnosis of aspergillosis in naturally infected penguins using different cut-off.....	54
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

DO	Densidade óptica
GM	Galactommanan
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
Ag	Antígeno
Ac	Anticorpo
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
IGM	Imunoglobulina M
PPV	Positive predictive value
NPV	Negative predictive value
AGID	<i>Antibodies Detected by Agar Gel Immunodiffusion</i>
IA	Invasive aspergilosis
EIA	Ensaio imunoenzimático
CRAM	Centro de Reabilitação de Animais Marinhos
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
FAMED	Faculdade de Medicina
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
UFC	Unidade formadora de colônia
LBA	Lavado broncoalveolar
LTB	Lavado traqueobrônquico
TC	Tomografia computadorizada

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
®	Marca Registrada
°C	Grau Celsius

Sumário

1	Introdução.....	20
2	Objetivos.....	21
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	Revisão da Literatura.....	23
3.1	<i>Aspergillus</i> e <i>Aspergilose</i>	23
3.2	Aspectos históricos	25
3.3	Caracterização do gênero <i>Aspergillus</i>	26
3.4	Diagnóstico geral da <i>Aspergilose</i>.....	29
3.4.1	Galactomanana.....	31
3.4.2	Galactomanana em aves silvestres	32
3.4.3	Platelia® <i>Aspergillus</i> EIA (Biorad)	34
3.4.3.1	<i>Taxas de falso positivo e falso negativo</i>	35
3.4.4	Interferência ambiental.....	36
3.5	Padronização de inóculo de <i>Aspergillus</i> e concentração de conídios.....	37
4	Artigos	39
4.1	Artigo 1.....	39
4.2	Artigo 2.....	45
5	Conclusões e Considerações Finais.....	52
	Referências.....	54
	Anexos.....	65

1 Introdução

A aspergilose é uma doença infecciosa não contagiosa causada por fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente aqueles pertencentes à seção Fumigati (ABARCA 2000, CARRASCO *et al.*, 2001, XAVIER *et al.*, 2011). A doença já foi descrita em diversas espécies, e dentre elas os pinguins, e por se tratar de uma micose de caráter oportunístico, ocorre em decorrência de fatores estressantes nessa espécie, como mudança de ambiente e manejo, injúrias ou outras comorbidades. No entanto, fatores anatômicos, fisiológicos e imunológicos conferem às aves uma alta suscetibilidade também à infecção primária principalmente *Aspergillus* seção Fumigati (GRACZYK & COKREM, 1995; REDIG, 1993; ROCHETTE, ENGELEN & BOSSCHE, 2003; SILVA-FILHO & RUOPPOLO, 2006; XAVIER *et al.*, 2007; 2008).

O curso clínico da aspergilose em pinguins é geralmente agudo, com manifestação tardia de sinais clínicos como dispneia, emaciação, letargia, anorexia e/ou frequentemente morte súbita. Caracteriza-se principalmente por uma enfermidade difusa do trato respiratório inferior, com comprometimento de sacos aéreos e pulmões, no entanto a forma traqueal, bem como a disseminação para órgãos como fígado, serosa do trato digestório e rins são comuns nesta espécie (CARRASCO *et al.*, 2001; XAVIER *et al.*, 2008).

Técnicas diagnósticas diretas para detecção do antígeno fúngico galactomanana (GM) em amostras clínicas têm sido utilizadas de modo crescente para o diagnóstico de AI (aspergilose invasiva) em humanos. A GM constitui-se de um polissacarídeo presente na parede celular de fungos do gênero *Aspergillus* cuja liberação ocorre especialmente durante o crescimento das hifas deste microrganismo em processo de invasão tecidual. Devido a sua característica hidrossolúvel, esta molécula pode ser considerada um marcador biológico importante na determinação da infecção fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. em distintas amostras clínicas (KLONT *et al.*, 2004; PFEIFFER *et al.*, 2006; MAERTENS *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2011).

A principal aplicabilidade do método de ELISA sanduíche disponível comercialmente (Platelia® *Aspergillus* EIA), que consegue detectar com alta especificidade o antígeno polissacarídeo em estágios precoces da doença, está no monitoramento dos níveis séricos de GM em pacientes de risco para AI, sendo um dos pilares centrais da terapia preemptiva, estratégia onde a terapia antifúngica é iniciada ou seu uso é postergado na dependência dos resultados de testes diagnósticos, porém antes da confirmação do agente etiológico (MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004; PFEIFFER *et al.*, 2006; MAERTENS *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2011, NUCCI, COLOMBO, 2012). Quando monitorada de forma seriada, a GM antecipa o diagnóstico de aspergilose invasiva em um intervalo de 6 a 14 dias em indivíduos neutropênicos (SINGH, 2005).

Embora sua aplicabilidade já esteja estabelecida para o diagnóstico precoce da AI em humanos, uma única testagem sérica pelo Platelia® *Aspergillus* EIA deve ser interpretada com cautela, pois a técnica apresenta algumas limitações. A taxa de resultados falso-negativos oscila entre 8 e 10% e está relacionada a quadros de encapsulação da infecção, formação de imunocomplexos por anticorpos anti-*Aspergillus* (em pacientes com menor imunossupressão), ou exposição prévia a agentes antifúngicos (como profilaxia) (XAVIER *et al.*, 2011).

Já a contaminação ambiental é descrita como causa de falso-positivo no Platelia® *Aspergillus* EIA. No entanto não há estudos na literatura que permitam inferir o grau de contaminação necessário para interferir no teste, não sendo possível afirmar que esta interferência está relacionada a uma contaminação massiva ou até mesmo ocorra com uma mínima quantidade de propágulos fúngicos contaminantes.

Em animais a aplicabilidade do Platelia *Aspergillus* EIA ainda não é bem elucidada (ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006, FISCHER *et al.*, 2014). Avaliar a eficácia do teste para diagnóstico da doença em pinguins é dado altamente relevante, uma vez que a AI em pinguins tem altas taxas de mortalidade em animais cativos e que o diagnóstico usado atualmente ainda é o *post-mortem*, limitando na maioria das vezes o aumento das taxas de reabilitação desses animais. Esse tipo de estudo está justificado e embasado em estudos anteriores com pinguins e outras espécies de aves onde houve significativas taxas de sensibilidade e especificidade para o teste utilizado (ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; CRAY *et al.*, 2009 a, b; FISCHER *et al.*, 2014).

1 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia do teste Platelia *Aspergillus* EIA® (BioRad-EUA) como método diagnóstico da aspergilose em pinguins e estudar a influência da contaminação ambiental como fator de interferência determinante de resultados falso-positivos no teste.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo e negativo do teste de ELISA sanduíche (Platelia *Aspergillus* EIA®) no diagnóstico da aspergilose em pinguins a partir de amostras séricas;
- ✓ Determinar a quantidade mínima de propágulos fúngicos de *A. fumigatus* capaz de gerar um resultado positivo no Platelia *Aspergillus* EIA® (BioRad);
- ✓ Comparar a diferença de concentração de galactomanana liberada por conídios de distintos isolados clínicos de *Aspergillus* seção Fumigati.

3 Revisão da Literatura

3.1 *Aspergillus* e Aspergilose

Os fungos do gênero *Aspergillus* são ubíquos de distribuição universal, cosmopolitas podendo ser encontrados no solo, água, plantas, ar e material em decomposição. Excepcionalmente esses fungos filamentosos são considerados sapróbios do trato respiratório alto (HORVATH; DUMMER, 1996; EINSELE *et al.*, 1998; LATGÉ, 1999; HERBRECHT *et al.*, 2004; XAVIER; FARIA, 2009).

O gênero *Aspergillus* possui aproximadamente 200 espécies fúngicas, destas cerca de 20 são consideradas potencialmente patogênicas e apenas cinco conseguem desenvolver-se em temperaturas de 35-37°C (ABARCA, 2000; KLICH, 2002; TELL, 2005).

As espécies mais importantes são *Aspergillus fumigatus*, espécie termotolerante, mais relatada em países subtropicais; e *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. terreus*, comumente encontradas em países de clima temperado (LATGÉ, 1999; MARR; PATTERSON; DENNING, 2002; RAJA; SINGH, 2006).

Fungos comensais podem ser responsáveis por micoses oportunistas, tendo o número de registros destas ocorrências aumentado e *Aspergillus* spp. é um destes responsáveis por inúmeras formas de apresentação da aspergilose (AQUINO; GOLDANI; PASQUALOTO, 2007; AQUINO *et al.*, 2010).

Esta micose não é contagiosa e a infecção ocorre através dos conídios infectantes, que se disseminam pelo ar e penetram no organismo, principalmente por via inalatória (LATGÉ, 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004). Naturalmente estes propágulos, em indivíduos imunologicamente competentes, são eliminados pela resposta imune inata, não causando algum dano ao organismo (LATGÉ, 1999, 2001).

O caráter multifatorial da aspergilose aplica-se aos diversos fatores pelos quais o indivíduo pode desenvolvê-la, tendo em comum a imunossupressão por causas variadas, tais como: uso de drogas citotóxicas, corticosteroides, transplantes

de órgãos sólidos, células-tronco, intervenções médicas invasivas, associação com síndromes imunossupressoras como a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), bem como uso de antimicrobianos de amplo espectro favorecendo o ambiente para desenvolvimento de micro-organismos (SLAVIN *et al.*, 2004; RICHARDSON, 2005; NOURRY *et al.*, 2005; PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007). A aspergilose pode ocorrer em várias espécies como humanos, canídeos, felídeos, equídeos, ruminantes (mamíferos) e principalmente nas aves, tanto domésticas quanto silvestres, em ovos embrionados, onde representa grande problema em aves de produção, quanto em animais jovens e adultos, não sendo atribuída a idade (AINSWORTH; AUSTWICK, 1973; JORDAN; PATTISON, 1997; FORBES, 1999; ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; KANO *et al.*, 2012).

A apresentação clínica da doença pode ser variada e depende do sítio anatômico acometido, da imunidade do hospedeiro e da capacidade infectiva das diferentes espécies de *Aspergillus* que podem infectar. Podem ocorrer desde processos alérgicos simples até infecções sistêmicas (DENNING, 2010).

A aspergilose invasiva (AI) é uma micose oportunista que adquiriu grande importância nas últimas décadas, devido ao aumento do número de pacientes imunologicamente suprimidos, em especial indivíduos neutropênicos, transplantados e usuários de corticosteroides. Em humanos a aspergilose invasiva é a forma clínica mais frequente desde a década de 90. Atualmente apresenta elevadas taxas de mortalidade causadas principalmente por *A. fumigatus* (YAMAZAKI *et al.*, 1999; KONTOYIANNIS; BODEY, 2002; MARR; PATTERSON; DENNING, 2002).

Em aves silvestres a espécie fúngica mais comumente isolada é *Aspergillus fumigatus* com taxas de 95% de isolamento, isolada pela primeira vez dos pulmões de uma "Great Bustard" (*Otis tarda*) em 1863 por Frenesius (QUINN *et al.*, 1994; RICHARD, 1997; HEIDENREICH, 1997). É a causa *mortis* em 15-30% das aves de rapina (Strigiformes - corujas e Falconiformes - falcões, abutres, condores, águias, gaviões) em cativeiro em zoológicos, aquários ou centros de reabilitação (YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998; ABRAMS *et al.*, 2001).

Em animais selvagens existem relatos de aspergilose pulmonar, causada por *A. corymbifera* e *A. fumigatus* (MONTEROS *et al.*, 1999) e abscessos no parênquima pulmonar (EGGERT; ROMBERG, 1960; GRIFFIN, 1969; PICKETT *et al.*, 1985; SEVERO *et al.*, 1989; EI-KHOULY *et al.*, 1992).

Espécies de *Aspergillus* são conhecidas há décadas como patógenos importantes de aves, culminando com altas taxas de mortalidade, inclusive nas da família *Spheniscidae*, sendo cerca de 90-95% dos casos de aspergilose causadas por *Aspergillus* seção *Fumigati* (CRAY *et al.*, 2009 a; XAVIER *et al.*, 2011; CABANA *et al.*, 2015).

As aves podem apresentar dermatite necrótica, ceratite e lesões extensas ou focais no trato respiratório inferior, de forma aguda ou crônica (XAVIER *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2011). A forma aguda ocorre a partir da inalação e germinação de grande concentração de conídios, com rápida e massiva colonização fúngica, formando granulomas miliares nos pulmões e curso clínico rápido. É vista com maior frequência em aves selvagens ou silvestres de cativeiro como psitacídeos encontrados em más condições sanitárias (REDIG, 1993; 1986; 2000; AGUILAR; REDIG, 1995; ROSSKOF; WOERPEL, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998). O principal sinal clínico é dispneia intensa, evoluindo para o óbito em aproximadamente sete dias (FORBES, 1991; AGUILAR; REDIG, 1995; ROSSKOF; WOERPEL, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998; YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998).

Na aspergilose crônica ocorrem granulomas no trato respiratório que tendem a se disseminar para órgãos adjacentes mais lentamente. É a forma mais comum da doença encontrada em aves e geralmente ocorre após um evento de estresse ou imunossupressão (REDIG, 1986; AGUILAR; REDIG, 1995; ATKINSON; BROJER, 1998; YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998). A aspergilose crônica é dividida em focal e generalizada, mas as formas podem coexistir (REDIG, 1993; 2000; BAUCK, 1994; AGUILAR; REDIG, 1995; RICHARD, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998; RAMIREZ; CHAVÉZ; VELASCO, 2002).

3.2 Aspectos históricos

A denominação *Aspergillus* foi utilizada pela primeira vez pelo padre italiano P.A. Micheli, em alusão ao instrumento de estrutura semelhante à estrutura de esporulação do fungo, o aspersório (*aspergillum*), (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004).

A doença foi primeiramente relatada em 1847 (Sluyter) e 1856 (Virchow). Em 1926, Thom e Church publicam o livro *The Aspergilli* (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA,

2004). Em 1952, Hinson descreveu problemas respiratórios e alérgicos associados ao fungo. A classificação inicial destes fungos data de 1979, sendo que em 1988 Samson & Pitt estabeleceram a classificação atualmente utilizada para o gênero *Aspergillus* (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004).

O gênero *Aspergillus* sp. foi descrito pela primeira vez por Rayer e Montagne (1842) nos sacos aéreos de um curió (*Oryzoborus angolensis*) e em aves selvagens no início dos anos 1800 (RICHARD, 1997; FRIEND; FRANSON, 1999; RAMIREZ; CHAVEZ; VELASCO, 2002).

Raper & Fennell em 1965 identificaram 132 espécies subdivididas em 18 grupos do gênero *Aspergillus*. Porém, em função de novos métodos de classificação e identificação baseados em filogenia, morfologia e técnicas biomoleculares muitas espécies novas de *Aspergillus* estão sendo descritas correlacionando o gênero com seus teleomorfos (FELSENSTEIN, 1985; GEISER; FRISRAD; TAYLOR, 1998; KLICH, 2002; KATZ *et al.*, 2005).

Nos últimos 20 anos, a aspergilose tornou-se uma micose de importância extraordinária na área da saúde, devido ao aumento concomitante do número de pacientes imunologicamente suprimidos predispostos a infecções e pela contribuição das alterações climáticas globais, que favorecem e criam um ambiente ideal ao surgimento dos fungos ubíquos como causadores de enfermidades, caso do *Aspergillus* sp. Neste contexto, a aspergilose, é considerada a micose mais frequente envolvida na mortalidade de pacientes imunologicamente suprimidos (LATGÉ, 1999; STEVENS *et al.*, 2000; WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000, XAVIER *et al.*, 2011; CABANA *et al.*, 2013).

3.3 Caracterização do gênero *Aspergillus*

A caracterização das espécies utiliza chaves de identificação, cruzando características macro e micromorfológicas (RAPER; FENNELL, 1965; ABARCA, 2000; KLICH, 2002).

As novas taxonomias do gênero são classificadas utilizando caracteres fenotípicos e sequências de DNA, abordando micro e macromorfologia, fisiologia e produção de metabólitos. Assim, atualmente novos “taxon” foram adicionados ao

gênero, como *Emericella* e *Neosartorya* (KOZAKIEWICZ, 1989; PETERSON *et al.*, 2001; BULPA; DIVE; SIBILLE, 2007; DEAK; BALAJEE, 2010).

A classificação taxonômica tradicional dos *Aspergillus* com base apenas nos caracteres fenotípicos nos mostra uma delimitação de taxon satisfatória. Porém, as várias seções com grande variação morfológica de gênero podem resultar em esquemas taxonômicos discutíveis, por isto precisam estar bem estabelecidas para servirem de referência a novas taxonomias. Assim, as principais espécies do gênero: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* passam a ser tratadas como complexos ou seções, acrescentando diversas e diferentes espécies, com distinta suscetibilidade antifúngica (BULPA; DIVE; SIBILLE, 2007; DEAK; BALAJEE, 2010).

As novas classificações, estudadas a partir de 2001 são *Aspergillus* seção *Circumdati*, *Flavi*, *Fumigati* e *Nigri*, demonstrando que cada táxon *Aspergillus* tem um perfil diferenciado, diferente do estudado e elucidado anteriormente na forma clássica (KOZAKIEWICZ, 1989; PETERSON *et al.*, 2001).

Atualmente, o gênero está bem subdividido e, 22 distintas sessões, sendo as mais patogênicas: *Fumigati*, *Circumdati*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Ornati*, *Warcupi*, *Candidi*, *Restricti*, *Usti*, *Flavipedes* e *Versicolor*, contendo espécies de relevância clínica (PETERSON *et al.*, 2008; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2015).

Na seção *Fumigati* as variedades de espécies são identificadas de acordo com as características macro e micromorfológicas, características de crescimento (tempo, temperatura, umidade) e perfis de β -tubulina no sequenciamento de genes, além de genes de calmodulina e actina sequenciados por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), cromatografia gasosa e HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (FRISVAD; THRANE, 1987; SMEDSGAARD, 1997).

Neosartorya pseudofischeri, um teleomorfo de *Aspergillus* também foi relatado como potencial agente patogênico e *A. lentulus* foi descrito como um agente patogênico relacionado com *A. fumigatus* (VARGA *et al.*, 2000; WALSH *et al.*, 2003). *Aspergillus lentulus* é uma espécie de distribuição mundial, podendo ser isolada do solo, ar e ambientes clínico-hospitalares (BALAJEE *et al.*, 2005), que difere fenotipicamente das demais pelo sequenciamento de cinco genes (MITCHELL; SLIGHT; DONALDSON, 1997; BALAJEE *et al.*, 2005). Esta espécie difere de *A. fumigatus* pelas estruturas micromorfológicas mais finas, menores, predominante presença de vesículas globosas e crescimento em aproximadamente 108°C de

temperatura (termotolerante) (BALAJEE *et al.*, 2005). Ressalta-se que *A. fumigatus* já teve seu genoma completamente sequenciado (NIERMAN; PAIN; ANDERSON, 2005; GALAGAN *et al.*, 2005).

As lesões da aspergilose são causadas pela produção de enzimas, adesinas, hemolisinas, proteases, peptidases e toxinas como fumagilina e gliotoxinas, liberadas pelo fungo, e associadas a deficiente resposta imune do hospedeiro (BLANCO *et al.*, 1998; LATGÉ, 1999, 2001; LEWIS *et al.*, 2005; SHOHAM; LEVITZ, 2005). Estas facilitam a colonização e a adesão do fungo na superfície corporal do hospedeiro, permitindo assim a invasão dos tecidos (MARR; PATTERSON; DENNING, 2002; GALLIEN *et al.*, 2008). Em contrapartida, o aspergiloma, ou bola fúngica, desenvolve-se em cavidade pré-existentes de indivíduos imunocompetentes (CARVALHO-DIAS *et al.*, 2008). Já a aspergilose broncopulmonar alérgica, configura uma reação de hipersensibilidade a presença dos fungos nas vias aéreas (CARVALHO-DIAS *et al.*, 2004; AQUINO *et al.*, 2010).

Passando por todas estas barreiras de proteção do organismo, os *Aspergillus* podem invadir a parede das vias aéreas e veias e artérias pulmonares adjacentes, causando trombose, necrose tecidual e disseminação sistêmica no organismo acometido (CAILLOT *et al.*, 1997).

A capacidade de invasão e multiplicação dos *Aspergillus* está diretamente relacionada a virulência da cepa, resposta imune do hospedeiro, exposição ao agente e quantidade de conídios inalados pelo hospedeiro. Atualmente, registra-se aumento de infecções fúngicas por *Aspergillus não-fumigatus*, com taxas de 25% na aspergilose pulmonar (RICHARDSON; WARNOCK, 2003; RICHARDSON, 2005).

Nas aves em geral, e principalmente dos pinguins à aspergilose é explicada anatomicamente pela ausência de epiglote, que facilita a passagem de partículas para o trato respiratório inferior, complementada pelo sistema mucociliar escasso, ausência de diafragma, resultando em ausência do reflexo da tosse e presença de sacos aéreos, estruturas ricas em oxigênio e pouco vascularizadas (TELL, 2005).

Além disso, a falta de macrófagos de superfície para fagocitose de conídios de *Aspergillus* spp. e a substituição de neutrófilos por heterófilos de baixa peroxidação, que utilizam proteínas catiônicas, hidrolases e lisozimas ao invés de mieloperoxidase e mecanismos oxidativos para destruição das hifas fúngicas contribui para a infecção fúngica em aves em geral e conseqüentemente nos pinguins (TELL, 2005). Outros fatores de manejo como transporte, superlotação, má

nutrição, ventilação pobre, antibioticoterapia, administração de corticosteroides, doenças concomitantes e irritantes respiratórios (ex.: amônia, fumaça, desinfetantes voláteis) são considerados importantes e aumentam essa suscetibilidade (TELL, 2005).

O fator mais importante para o estabelecimento da aspergilose é o estado imunológico do hospedeiro, contribuindo em menor escala a patogenicidade e virulência do fungo (WANKE; LAZERA; NUCCI, 2000; LATGÉ; CALDERONE, 2002).

3.4 Diagnóstico geral da Aspergilose

O diagnóstico definitivo da aspergilose possui limitantes derivados de inúmeras razões (PASQUALOTTO, DENNING, 2005; WHEAT, WALSH, 2008).

As altas taxas de mortalidade atribuídas a esta doença são decorrentes especialmente da dificuldade de realização de um diagnóstico precoce (PAGANO *et al.*, 2007; PASQUALOTTO *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2011).

O diagnóstico da aspergilose é multivariado e acontece primeiramente da forma clássica em micologia com o cultivo de amostras clínicas e microscopia direta para demonstrar a presença ou não de fungos do gênero *Aspergillus* (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). Estes métodos diagnósticos devem ser aliados a história clínica do paciente, presença de sinais clínicos como ausência de respostas a antibioticoterapia ou corticoidoterapia, situações de estresse, doenças de base, no entanto não são definidores da doença clínica. Em adição, outros exames auxiliares podem ajudar no diagnóstico final, como raio-x, ultrassom, tomografia, além de endoscopias e hemograma (LATGÉ, 1999; XAVIER *et al.*, 2007; 2011; CABANA *et al.*, 2012b).

No método micológico tradicional, as espécies de *Aspergillus* crescem facilmente em meio de cultivo clássico como ágar Sabouraud dextrose e desenvolvem colônias fúngicas pulverulentas em 24-48 horas de incubação a 25-37° (MARR; PATTERSON; DENNING, 2002). Os meios de cultivo específicos para identificação de espécies de *Aspergillus* como ágar Czapeck, ágar Malte e ágar Potato Dextrose (PDA) auxiliam na identificação das espécies (GAVA, 2002; KLICH, 2002).

As cepas de *A. fumigatus* apresentam crescimento rápido, coloração do verso azul-esverdeada e reverso branco a amarelado. Microscopicamente apresentam conidióforos lisos e hialinos, vesícula piriforme e fiálides unisseriadas (XAVIER; FARIA, 2009).

No entanto, exames micológicos clássicos apresentam baixa sensibilidade e/ou especificidade, e, a utilização de testes sorológicos, embora indicada na literatura (TELL, 2005; CABANA *et al.*, 2015) não é de uso rotineiro, assim, o padrão ouro ainda se restringe a exames histopatológicos e micológicos *post-mortem* (CRAY *et al.*, 2009 a; CRAY *et al.*, 2009 b).

No exame microscópico direto das amostras clínicas realizado a fresco, com calcofluor branco, ou solução de hidróxido de potássio (KOH) 10-30% podem-se observar hifas septadas, ramificadas em ângulo agudo de 45° (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007).

O grande desafio no manejo das enfermidades causadas por *Aspergillus* sp. é a obtenção de diagnóstico definitivo precoce, para tanto, utiliza-se exames como histopatologia, hematologia ou sorologia (XAVIER *et al.*, 2011).

Culturas de secreções respiratórias possuem sensibilidade diagnóstica muito baixa: *Aspergillus* é recuperado em cultivo do escarro e do LBA em apenas 8-34% e 45-62% dos pacientes com aspergilose invasiva, respectivamente. A confirmação diagnóstica usualmente requer avaliação histopatológica, no entanto, quadros de neutropenia ou trombocitopenia comumente impedem a realização de procedimentos cirúrgicos invasivos nestes pacientes. Biópsias transbrônquicas, por outro lado, são associadas a uma frequência elevada de resultados falso negativos. Culturas de sangue, líquido e medula óssea raramente são positivas para *Aspergillus* spp. A tomografia computadorizada (TC) de tórax em alta resolução é um recurso auxiliar de grande importância no diagnóstico precoce de aspergilose pulmonar invasiva em indivíduos neutropênicos, particularmente na presença do chamado “sinal do halo” (halo de necrose envolvendo nódulo pulmonar) (WANKE *et al.*, 2000; STEVENS *et al.*, 2000; SINGH, PATERSON, 2005; WHEAT, WALSH, 2008).

No entanto, este sinal é menos comumente encontrado em não neutropênicos, e aspergilose pulmonar invasiva em pacientes transplantados de pulmão, por exemplo, mais frequentemente se manifesta do ponto de vista radiológico por áreas de consolidação em placa (SINGH, HUSAIN, 2003).

Em aves, o diagnóstico *ante mortem* de aspergilose invasiva (AI) é limitado e técnicas tradicionais, como exames hematológicos, exames bioquímicos e exames de imagem podem revelar apenas alterações inespecíficas (XAVIER et al., 2007; 2008; 2011).

O diagnóstico sorológico da aspergilose atualmente se baseia em técnicas como IDGA (Imunodifusão Radial Dupla em Gel de Ágar) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), além de técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A sorologia permite diagnóstico *in vivo* preciso e precoce (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; GRACZYK; CRANFIELD, 1995; GRACZYK; CRANFIELD; KLEIN, 1998; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BURCO et al., 2012).

Técnicas mais modernas de diagnóstico direto da aspergilose por detecção do antígeno galactomanana (GM) em amostras clínicas têm sido cada vez mais utilizadas para o diagnóstico de AI em humanos e pioneiramente em animais, a partir de diferentes espécimes (CRAY et al., 2009; 2011; PASQUALOTTO, DENNING, 2005; PASQUALOTTO et al., 2010; LAHMER et al., 2016).

3.4.1 Galactomanana

A galactomana (GM) é um polissacarídeo presente na parede celular de fungos filamentosos, entre eles os do gênero *Aspergillus*, uma família de antígenos derivados da galactofuranose. Sua liberação para a corrente sanguínea ocorre durante o crescimento das hifas no processo de invasão tecidual (MENNINK-KERSTEN et al., 2004; MAERTENS et al., 2007). Esta molécula pode ser considerada como um biomarcador importante na determinação da infecção fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. em diferentes amostras clínicas por ser hidrossolúvel (KLONT et al., 2004; PFEIFFER et al., 2006; MAERTENS et al., 2007; XAVIER et al., 2011).

A detecção de 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 (MENNINK-KERSTEN, 2004).

Este polissacarídeo é detectado pela técnica de ELISA sanduíche, através do teste comercial Platelia *Aspergillus*® (BioRad-França) que apresenta alta especificidade e sensibilidade, detectando níveis baixos da GM circulante no plasma

sanguíneo ou outros fluídos corporais (STYNEN *et al.*, 1995; VERWEIJ *et al.*, 1995; HOPWOOD *et al.*, 1995; MENNINK-KERSTEN, 2004; ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; AQUINO; GOLDANI; PASQUALOTTO, 2007; CRAY *et al.*; 2011).

Por ser um hidrato de carbono solúvel em água é que a GM possui a capacidade de ser detectável em outros fluídos corporais, como por exemplo a urina (ANSORG *et al.*, 1994).

Reações cruzadas no Platelia *Aspergillus* GM podem ser notadas com *Penicillium spp.*, porém são consideradas ainda de pouca relevância, uma vez que *Penicillium spp.* é de pouca importância clínica como causador de patologias em humanos e animais, principalmente em aves (CRAY *et al.*, 2009a; PASQUALOTTO, DENNING, 2005).

Em geral os testes com GM parecem ser uma ferramenta diagnóstica altamente específica, mesmo que a sensibilidade tenha variado de 50% a 93% em pacientes com malignidade hematológica (MAERTENS *et al.*, 1999; 2001).

Porém discussões sobre o melhor *cutt-off* nos ensaios com GM persistem (PASQUALOTTO, DENNING, 2005)

Neste sentido, técnicas diretas para detecção do antígeno fúngico galactomanana em amostras clínicas têm sido utilizadas de modo crescente para o diagnóstico de AI em outras espécies, além da humana.

3.4.2 Galactomanana em aves silvestres

Estudos com detecção de galactomanana como técnica diagnóstica de aspergilose em aves são raros na literatura. A detecção de galactomanana por aglutinação em látex (Pastorex® *Aspergillus*) em amostras séricas de pinguins com aspergilose, comprovou a eficácia da utilização deste teste, porém esta técnica caiu em desuso e não é mais utilizada para diagnóstico precoce (HOPWOOD *et al.*, 1995; KOICHI; MICHIHIRO, 1996).

No entanto, mais recentemente, Arca-Ruibal *et al.* (2006) testaram a eficácia da detecção da galactomanana sérica para diagnóstico de aspergilose em falcões, pelo método de ELISA sanduíche (Platelia® *Aspergillus* EIA) encontrando sensibilidade de 12%, extremamente baixa e atribuída a interferência de anti-*Aspergillus* circulantes, porém, obtiveram uma boa especificidade, 95%. Posteriormente, utilizando a mesma metodologia para diagnóstico de aspergilose em

aves obteve-se resultados distintos, demonstrando taxas de sensibilidade e especificidade relativamente altas, representativas da realidade em cativeiro (67% e 73%, respectivamente) (CRAY *et al.*, 2009 a, b; CABANA *et al.*, 2013).

Um estudo avaliou pela primeira vez a aplicabilidade do kit comercial Platelia *Aspergillus* EIA® para o diagnóstico da aspergilose em pinguins-de-Magalhães naturalmente infectados, não encontrando diferença significativa nos índices de GM entre animais com e sem a enfermidade. Um único estudo com população similar foi descrito por Cray *et al.*, 2009a, no entanto os autores incluíram 56 aves com aspergilose, das quais apenas três eram pinguins, não sendo possível extrapolar os resultados de eficácia do teste obtidos pelos autores para a família *Sphenisciforme*.

Em aves domésticas e silvestres de distintas famílias e ordens, incluindo algumas espécies de *falconiformes*, *psitaciformes*, *anseriformes* e *galliniformes*, são descritos estudos relacionados a eficácia da detecção de GM para diagnóstico da aspergilose demonstrando taxas de sensibilidade variando de 12 a 67% e de especificidade entre 73 e 95% utilizando 0,5 como ponto de corte (CRAY *et al.*, 2009a; CRAY *et al.*, 2009b; ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; FISCHER *et al.*, 2014; DHAMA *et al.*, 2013; FRANCA *et al.*, 2012). Estudos com taxas de 86,2% de sensibilidade e 265,1% de especificidade foram encontrados em pinguins-de-Magalhães, utilizando pontos de corte de 0,5; 1; 1,5 e 2 (CABANA *et al.*, 2013; 2015).

Fatores como diferentes espécies animais incluídas nos estudos, tempo de evolução e desenvolvimento da aspergilose nestas aves, bem como apresentação clínica da doença (sítio de infecção) e resposta imune das diferentes espécies de aves (DEEM, 2003; TELL, 2005) podem estar relacionados aos resultados contraditórios encontrados em diferentes estudos (ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; CRAY; WATSON; ARHEART, 2009a; CRAY; WATSON; RODRIGUEZ; ARHEART, 2009b) e/ou detecção de outros antígenos, como β -glucana (BURCO *et al.*, 2012), além de técnicas de biologia molecular.

Estudos com IDGA, para detecção de anticorpos IgG que apresentem taxas de sensibilidade e especificidade superiores a 80% são descritas em poucos relatos em cães com aspergilose sinonasal (SHARP *et al.*, 1984) e em maior quantidade em humanos com aspergiloma (BABATASI *et al.*, 2000) e rinosinusite (CAMELI-ROJAS *et al.*, 2004) onde em ambos a técnica é considerada padrão-ouro para diagnóstico.

Em pinguins, existem poucos estudos a respeito de métodos diagnóstico da

aspergilose, sendo descrito estudos através da detecção de antígeno galactomanana, anticorpos circulantes e detecção de antígeno β -glucana (GRACZYK; COCKREM, 1995; GRACZYK; CRANFIELD; KLEIN, 1998; GERMAN *et al.*, 2002; CRAY; WATSON; ARHEART, 2009a; CRAY; WATSON; RODRIGUEZ; ARHEART, 2009b; BURCO *et al.*, 2012).

3.4.3 Platelia® *Aspergillus* EIA (Biorad)

O Platelia *Aspergillus* EIA® (BioRad-EUA) é um kit diagnóstico disponível comercialmente que se baseia na técnica ELISA sanduíche para detecção de galactomanana (MAERTENS *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2011). Este teste é padronizado para amostras de soro sanguíneo e de lavado broncoalveolar de pacientes humanos e neutropênicos, e quando realizado de forma seriada, antecipa o diagnóstico da aspergilose (MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004; NUCCI, COLOMBO, 2012).

A principal aplicabilidade do método de ELISA sanduíche disponível comercialmente (Platelia® *Aspergillus* EIA), que consegue detectar com alta especificidade o antígeno polissacarídeo em estágios precoces da doença, está no monitoramento dos níveis séricos de GM em pacientes de risco para AI, sendo um dos pilares centrais da dita terapia preemptiva, estratégia onde a terapia antifúngica é iniciada ou seu uso é postergado na dependência dos resultados de testes diagnósticos, porém antes da confirmação do agente etiológico (MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004; PFEIFFER *et al.*, 2006; MAERTENS *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2011; NUCCI, COLOMBO, 2012).

Quando monitorada de forma seriada, a galactomanana antecipa o diagnóstico de aspergilose invasiva em um intervalo de 6 a 14 dias em indivíduos neutropênicos (SINGH, 2005), podendo ser considerada como critério microbiológico para classificação da AI em comprovada, provável e possível de acordo com EORTC/MSG (PAUW *et al.*, 2008).

Embora, o teste ELISA sanduíche para a detecção GM seja considerado uma importante ferramenta de diagnóstico para AI em humanos, estudos demonstram que este pode também contribuir para o diagnóstico em outras espécies, como cães, bovinos e aves (XAVIER *et al.*, 2011; NUCCI, COLOMBO, 2012; CRAY *et al.*, 2009b; ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2001; 2008; BILLEN *et al.*, 2009;

GUILLOT *et al.*, 1999; JONES, OROSZ, 2000; FRANCA *et al.*, 2012). No entanto, não existem protocolos e indicações para seu uso em pinguins.

3.4.3.1 Taxas de falso positivo e falso negativo

Algumas limitações do teste de detecção da GM são descritas, e as taxas de resultados falso-negativos e falso-positivos flutuam em torno de 10% (MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004; NUCCI, COLOMBO, 2012).

Embora a aplicabilidade do teste ELISA a partir da demonstração da cinética da GM circulante, já esteja estabelecida para o diagnóstico precoce da AI, uma única testagem sérica pelo Platelia® *Aspergillus* EIA deve ser interpretada com cautela, na medida em que o método apresenta algumas limitações. A taxa de resultados falso-negativos está relacionada a quadros de encapsulação da infecção, formação de imunocomplexos por anticorpos anti-*Aspergillus* (em pacientes com menor imunossupressão), ou exposição prévia a agentes antifúngicos (como profilaxia). Diversos estudos têm comprovado que reações cruzadas com outras infecções fúngicas, uso de antibióticos de origem fúngica, mucosite, ou ainda enfermidade do enxerto *versus* hospedeiro estão entre as principais causas de falso-positivos no Platelia® *Aspergillus* EIA, que usualmente varia entre 8-14% (MENNINK-KERSTEN *et al.*, 2004; TANRIOVER *et al.*, 2005; AQUINO *et al.*, 2007; WHEAT, WALSH, 2008; XAVIER *et al.*, 2009a, 2009b, 2011).

Também são considerados em testes de detecção de GM, os resultados falso-positivos atribuídos ao uso de moléculas de antibióticos beta-lactâmicos, como a piperacilina-tazobactam, de origem fúngica, que conseqüentemente apresentam em sua composição moléculas de galactofuranose, reagindo os anticorpos utilizados no teste (MAERTENS; THEUNISSEN; LAGROU, 2010). Do mesmo modo, o gluconato de sódio é produzido pela fermentação da glicose em culturas de fungos gerando reações com o teste ou reações cruzadas com outros fungos que podem reagir com os anticorpos do teste. Ou ainda em casos de bacteremia e ingestão de leite ou outros alimentos que contenham resquícios de *Aspergillus* sp. ou *Penicillium* sp. em sua composição (AQUINO; GOLDANI; PASQUALOTTO, 2007).

Na tentativa de reduzir a taxa de falsos-positivos, autores recomendam a testagem em ao menos duas coletas de soro ou LTB consecutivas e ainda o uso de outras amostras clínicas como urina por exemplo (CRAY *et al.*, 2009a; 2009b;

ARCA-RUIBAL *et al.*, 2006; PASQUALOTTO *et al.*, 2010; VERWEIJ *et al.*, 1995).

A contaminação ambiental, também apontada e frequentemente citada como fator importante de interferência nos resultados do teste e possível causa de falso-positivo, tem sido pouco estudada, tanto no âmbito do processamento laboratorial para realização da técnica de ELISA quanto no momento da coleta da amostra clínica, armazenamento e transporte da mesma até seu processamento.

3.4.4 Interferência ambiental

Os fungos do gênero *Aspergillus*, liberam no ambiente durante sua reprodução uma grande quantidade de conídios de tamanhos variados dependendo da espécie (LATGÉ, 1999; 2001). Assim, constantemente o hospedeiro está em contato com estes conídios na atmosfera, que apresentam altas e rápidas taxas de crescimento e podem colonizar a mucosa respiratória através da inspiração (TEKAIA; LATGÉ, 2005, ARAÚJO, RODRIGUES, 2004). Estes propágulos são primariamente fagocitados e destruídos pelos macrófagos alveolares e outras células de defesa presentes na mucosa do trato respiratório (GALLIEN *et al.*, 2008).

A alta densidade de conídios ambientais de *Aspergillus* é um fator significativo para o desenvolvimento de infecção invasiva, principalmente em pacientes hematológicos e imunocomprometidos (CAVALLO *et al.*, 2013; SEYEDMOUSAVI 2015).

Atualmente, existem estudos comprovando a capacidade de fungos filamentosos, assim como *Aspergillus fumigatus* de formarem biofilme e apresentarem assim maior capacidade de contaminação e resistência a antifúngicos (MOWATT *et al.*, 2009; FANNING, MITCHELL, 2012; VILLA, ROZENTAL, 2016).

Embora o teste de detecção de galactomanana sérica pela técnica de ELISA sanduíche seja considerado uma importante ferramenta diagnóstica para AI e atualmente possa contribuir como fator decisivo para início da terapia antifúngica preemptiva em pacientes de risco para a doença (NUCCI, COLOMBO, 2012), no Brasil, a realização do mesmo está ainda restrita a centros de referência, não sendo um teste disponível na rotina de diagnóstico laboratorial de todos os hospitais onde se monitoram pacientes de risco para AI e não existindo maiores estudos sobre a influência ambiental no teste.

Neste sentido, as amostras clínicas necessitam ser encaminhadas para outros hospitais para realização do exame, o que torna essencial o conhecimento de fatores, associados ao processo de armazenamento e transporte, que possam interferir no teste e culminar com resultados falso-positivos, a fim de evitá-los para prover maior fidedignidade à interpretação dos resultados. Dentre estes fatores ressalta-se que a contaminação ambiental é citada como causa de falso-positivo no Platelía® *Aspergillus* EIA por diversos autores, no entanto não há estudos na literatura que permitam inferir o grau de contaminação necessário para interferir no teste, não sendo possível afirmar que esta interferência está relacionada a uma contaminação massiva ou até mesmo ocorra com uma mínima quantidade de propágulos fúngicos contaminantes. Este dado é de extrema relevância considerando que o tempo entre coleta e processamento laboratorial da amostra clínica pode superar 24 horas e que *Aspergillus fumigatus* 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), o que leva a formação rápida de hifas as quais liberam maior quantidade de GM do que os conídios podendo levar a uma maior interferência no teste de detecção de GM em amostras contaminadas.

Monteiro *et al.*, (2016), identificou uma alteração significativa em algumas variáveis bioquímicas nas amostras clínicas utilizadas para o teste GM quando mantidas à temperatura ambiente (20-25°C), após um período de 72-96hs, o que pode prejudicar a qualidade da amostra a ser utilizada para o diagnóstico, se estas não forem processadas nas primeiras 24 horas, corroborando com poucos estudos onde percebe-se os riscos de falso positivos se a amostra clínica utilizada estiver contaminada no momento da coleta ou durante o transporte ou armazenamento

3.5 Padronização de Inóculo de *Aspergillus* e concentração de conídios

Poucos estudos avaliaram a estabilidade de curto prazo de amostras clínicas testadas para GM, com isso, torna-se pioneiro, ao realizar a reprodutibilidade de testes de GM com inóculos fúngicos contaminados com *Aspergillus* seção Fumigatti, mimetizando assim uma amostra clínica positiva para detectar, a capacidade do teste de sofrer efeitos de contaminação ambiental.

Sabemos que por *Aspergillus* sessão *Fumigati* serem fungos oportunistas e potenciais contaminantes ambientais (CABANA *et al.*, 2015), necessitam de uma carga conidial um pouco mais robusta para gerar níveis de GM detectáveis ao teste realizado para diagnóstico em AI.

Testes para padronização de inóculos de baixa concentração de *A. fumigatus* são realizados a partir de cepas derivadas de casos clínicos ou do ambiente. Inicialmente estas cepas devem ser subcultivadas em tubos de ensaio contendo ágar batata-dextrose por até 48hs a 36°C para obtenção de colônias jovens, após este período é realizado uma raspagem da superfície das colônias para obtenção de propágulos fúngicos adicionando alíquotas de solução salina estéril (0,85%) e Tween 80. Os inóculos são padronizados de acordo com a técnica de leitura espectrofotométrica e filtração, ajustadas em espectrofotômetro em filtro de 530nm para 80 a 82% de transmitância (0,18-0,20 de absorbância). Em seguida será realizada uma diluição de 1:50 em solução salina estéril conforme protocolo descrito, buscando obter uma concentração de $0,8 \times 10^4$ a 1×10^5 UFC/ml (CLSI, 2008).

A confirmação da quantidade de conídios pode ser determinada pela técnica de “*Pour Plate*” e por contagem dos conídios em câmara de Neubauer (CLSI, 2008; TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Platelia EIA® *Aspergillus* test for the diagnosis of aspergillosis in penguins

Cabana, Ângela Leitzke; Xavier, Melissa Orzechowski; Mendes, Josiara Furtado;
Teles, Alessandra Jacomelli; Martins, Aryse Moreira; Silva-Filho, Rodolfo Pinho;
Meireles, Mário Carlos Araújo

Submetido à Revista Brazilian Journal of Biology (BJB)

Applicability of PLATELIA EIA® *Aspergillus* test for the diagnosis of aspergilosis in penguins

A. L. Cabana^{a*}, M. O. Xavier^b, J. F. Mendes^a, A. J. Teles^c, A. M. Martins^{d,e}, R. P. Silva-Filho^e and M. C. A. Meireles^a

^a Programa de Pós-graduação em Veterinária, Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária – MICVET, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Av. Eliseu Maciel, s/n, Campus Universitário, CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil.

^b Faculdade de Medicina – FAMED, Departamento de Parasitologia e Micologia, Área de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Visconde de Paranaguá, nº 102, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil

^c Programa de Residência em Saúde Animal, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Av. Eliseu Maciel, s/n, Campus Universitário, CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil d Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Av. Eliseu Maciel, s/n, Campus Universitário, CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil

^e Centro de Recuperação de Animais Marinhos – CRAM, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Tenente Capitão Heitor Perdiggão, 10, Centro, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil
*cabanangela@gmail.com

Received: October 26, 2016 – Accepted: November 13, 2017 – Distributed: May 31, 2019
(With 2 figures)

Abstract

Even today, an effective diagnostic test for aspergillosis in penguins is unknown, being the gold standard post-mortem examinations. The fungal antigen galactomannan (GM) has been used as a biomarker of disease in humans and is detected by the Platelia *Aspergillus* EIA (BioRad)®, a commercial kit based on the sandwich ELISA technique. It is standardized for use in neutropenic patients, however studies have demonstrated its usefulness also possible for birds. The aim of our study was to evaluate the effectiveness of Platelia *Aspergillus* EIA® test (BioRad-US) in the diagnosis of aspergillosis in Magellanic penguins, determining sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for different cut-off points. Were included in the study, blood serum samples (n = 29) Magellanic penguins in captivity that died by aspergillosis. Detection of GM was performed following manufacturer's instructions and the GM index was obtained by dividing the average value of OD of the duplicate of the clinical sample by duplicate OD of the average value of the cut-off sample provided by the kit. Through information database results were obtained for the presence of anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies detected by agar gel immunodiffusion (AGID) for all serum samples. Results were analyzed using chi-square test and Kruskal-Wallis from SPSS 20.0, IBM®. ROC curve was obtained and from this, rates of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were also calculated based on four different cutoff points (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0). The serum GM index did not differ between animals of the case and control group (p_{kw}=0.097). In determining the ROC curve for serum GM detection the value of area under the curve was 0.635. From the values determined by the coordinate of the curve, four different cut points (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0) were analyzed, resulting in sensitivity rates ranging from 86.2 to 34.5% % and specificity between 87% and 26.1%. By comparing the serum GM index in group case as the presence or absence of antibodies detected by AGID was found p=0.503. The detection of GM the Platelia *Aspergillus* EIA® test seems is not be useful for the diagnosis of aspergillosis in naturally infected penguins.

Keywords: galactomannan, immunoenzymatic test, mycosis, birds.

Aplicabilidade do Platelia EIA® *Aspergillus* como teste diagnóstico da aspergilose em pinguins

Resumo

Ainda hoje, um teste diagnóstico eficaz para aspergilose em pinguins não é conhecido, sendo o padrão-ouro os exames post-mortem. O antígeno fúngico galactomanana (GM) tem sido utilizado como biomarcador da doença em humanos, sendo detectado pelo Platelia *Aspergillus* EIA (BioRad)®, um kit comercial que se baseia na técnica ELISA sanduíche. É padronizado para utilização em pacientes neutropênicos, no entanto estudos tem demonstrado sua possível utilidade também

para aves. O objetivo de nosso estudo foi avaliar a eficácia do teste Platelia *Aspergillus* EIA® (BioRad-US) no diagnóstico da aspergilose em pinguins-de-Magalhães, determinando sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos em diferentes pontos de corte. Foram incluídas no estudo, amostras de soro sanguíneo (n=29) de pinguins-de-Magalhães em cativeiro que vieram a óbito por aspergilose. A detecção de GM foi realizada seguindo instruções do fabricante e o índice de GM foi obtido dividindo o valor da média da DO da duplicata da amostra de cut-off fornecida pelo kit. Através de informações em banco de dados foram obtidos resultados sobre a presença de anticorpos anti-*Aspergillus fumigatus*, detectada por Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) em todas as amostras séricas. Os resultados foram analisados utilizando-se teste de qui-quadrado e Kruskal-Wallis a partir do programa estatístico SPSS 20.0, IBM®. Curva ROC foi obtida e a partir desta, taxas de sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo foram igualmente calculados considerando quatro diferentes pontos de corte (0.5, 1.0, 1.5 e 2.0). O índice de GM sérica não diferiu entre os animais do grupo caso e controle ($p_{KW} = 0.097$). Na determinação da curva ROC para detecção de GM sérica o valor da área sobre a curva foi de 0.635. A partir dos valores determinados pelas coordenadas da curva, quatro diferentes pontos de corte (0.5, 1.0, 1.5 e 2.0) foram analisados, resultando em taxas de sensibilidade variando de 86.2% a 34.5%, e de especificidade entre 87% e 26.1%. Ao comparar o índice de GM sérica nos animais do grupo caso quanto a presença ou não de anticorpos detectados pela IDGA foi encontrado $p=0.503$. A detecção de GM pelo teste Platelia *Aspergillus* EIA® não parece ser útil para o diagnóstico da aspergilose em pinguins naturalmente infectados.

Palavras-chave: galactomanana, teste imunoenzimático, micoses, aves.

1. Introduction

Aspergillus species have been known for decades as important pathogens of birds, leading to high mortality rates, including the *Spheniscidae* family, being about 90-95% of the cases of aspergillosis caused by *Aspergillus* section Fumigati (Cray *et al.*, 2009b; Cabana, 2013; Xavier *et al.*, 2011). The diagnosis *ante-mortem* of invasive aspergillosis (IA) in birds is limited and traditional techniques, such as blood tests, biochemical tests and imaging studies may reveal only nonspecific changes (Xavier *et al.*, 2011; 2008; 2007). Mycological classic tests have low sensitivity and / or specificity, and use of serological tests, although indicated in the literature (Cabana *et al.*, 2015; Tell, 2005) it is not in routine use, as the gold standard is still restricted to histopathological and mycological *post-mortem* (Cray *et al.*, 2009a, b). Modern techniques for the diagnosis of aspergillosis by direct detection of antigen galactomannan (GM) in clinical samples have been increasingly used for the diagnosis of IA in humans from different species. The GM is a polysaccharide present in the fungal cell wall of the genus *Aspergillus*, a family of derivatives galactofuranose antigens. Their release into the bloodstream occurs during the growth of hyphae in tissue invasion process (Mennink-Kersten *et al.*, 2004; Nucci and Colombo, 2012). This molecule can be considered as an important biomarker for the determination of invasive fungal infections by *Aspergillus* spp. in different clinical samples to be water soluble (Maertens *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2011). The Platelia *Aspergillus* EIA® (Bio-Rad USA) is a commercially available diagnostic kit which is based on sandwich ELISA for detection of galactomannan (Maertens *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2011). This test is standard for blood serum and bronchoalveolar lavage of human and neutropenic patients, and when performed serially, anticipates the diagnosis of aspergillosis within one week. Some limitations are described, and the rates of

false-negative and false-positive results fluctuate around 10% (Mennink-Kersten *et al.*, 2004; Nucci and Colombo, 2012).

Although the ELISA sandwich test for GM detection is considered an important diagnostic tool for AI in humans. Studies have shown that can also contribute to the diagnosis of other species such as dogs, cattle and poultry (Arca-Ruibal *et al.*, 2006; Billen *et al.*, 2009; Cray *et al.*, 2009a; Franca *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2008; Guillot *et al.*, 1999; Jones and Orosz, 2000; Nucci and Colombo, 2012; Xavier *et al.*, 2011). However, there are protocols and indications for its use in penguins.

Due to the high incidence of aspergillosis in penguins determining high mortality rates in these animals in captivity as well as the difficulty of the definitive diagnosis of *ante-mortem* disease in this species, this study aim to evaluate the effective of Platelia *Aspergillus* EIA® test (Bio-Rad-US) the diagnosis of aspergillosis in naturally infected Magellanic penguins, determining sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for different *cut-off* points.

2. Material and Methods

They were included in the study, blood serum samples of Magellanic penguins that died of aspergillosis during the rehabilitation period in the Centro de Recuperação de Animais Marinhos of Rio Grande - CRAM-FURG (n=29). The samples are stored in the mycology laboratory- FAMED-FURG, and all cases were confirmed from *post-mortem* examinations with mycological culture and histopathological examination. As a control group, were included over 23 serum samples from healthy Penguins CRAM-FURG, which they were rehabilitated and released to their natural habitat. All samples were aliquoted in biosafety cabinet to prevent contamination by airborne conidia and found themselves stored at -20 ° C. A single blood sample each animal was included and collected venipuncture

of the cephalic vein. All samples were obtained in a maximum period of 60 days (7-69) before death (case group) and / or release (control).

The GM detection was performed on all serum samples animals included in the study according to the manufacturer's instructions. In brief, 300ul of sample was added to 100ul of Platelia *Aspergillus* EIA® treatment solution into microtubes and subsequently arranged in the thermoblock for heat treatment for six minutes at 120° C. Then the wells were centrifuged at 10,000xg for 10 minutes. In sequence the strips were filled with 50ul conjugate and the sample supernatant and then the plate was incubated for 90 minutes at 37° C. Then the wells were centrifuged at 10,000xg for 10 minutes. In sequence the strips were filled with 50ul conjugate and the sample supernatant and then the plate was incubated for 90 minutes at 37° C. The reaction was terminated by addition of 1.5 N solution of sulfuric acid and reading the optical density (OD) at 450 nm with 620 nm reference filter. The tests were conducted in duplicate and reactions were all positive control samples used, and the negative cutoff point provided by the kits diagnostic. The GM index was obtained by dividing the average value of OD of the duplicate of the clinical sample by duplicate OD of the average value of the cut-off sample provided by the kit. From the database Laboratório de Micologia, It was obtained information about the presence of anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies detected by agar gel immunodiffusion (AGID) for all serum samples.

Results were analyzed using chi-square test and Kruskal-Wallis from SPSS 20.0, IBM®. ROC curve was obtained and from this, rates of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were also calculated based on four different cutoff points (0.5, 1.0, 1.5 e 2.0).

3. Results

The serum GM index did not differ between animals in the case group and control ($p_{KW} = 0.097$). The penguins with aspergillosis ($n = 29$) GM index ranged from 0.29 to 6.5, with a median of 0.91 and mean of 1.71, while the healthy animals ($n = 23$) the median was 0.75 and 1.13 average (varying from 0.31 to 4.83) (Figure 1).

From these values it was determined the ROC (Receiver Operating Characteristic) for serum GM detection in the diagnosis of aspergillosis in penguins, where the x-axis (x) is the true positive (sensitivity) and the ordinate axis (y) is false positive (1- specificity) (Figure 2). The analysis of the test demonstrated a precision index value of the area under the curve of 0.635 (0.482 to 0.788 CI) ($p = 0.097$).

From the values determined by the coordinate of the curve four different cut points (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0) were analyzed, resulting in sensitivity rates

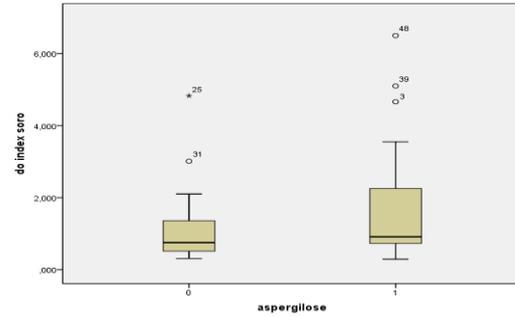


Figure 1: Serum GM indexes in samples from healthy penguins (0) and from penguins with aspergillosis (1)

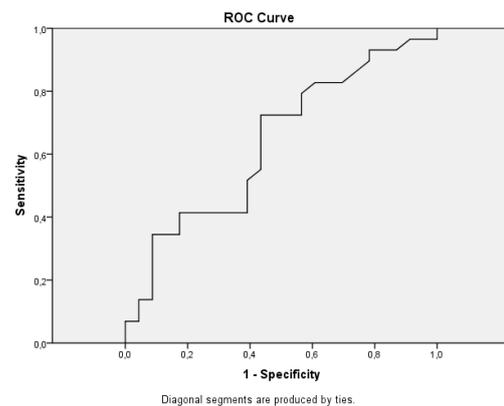


Figure 2: ROC curve of serum GM detection to diagnosis of aspergillosis in penguins.

Tabela 1: Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of serum GM detection in the diagnosis of aspergillosis in naturally infected penguins using different cut-off

Cut Off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
≥2.0	34.5	91.3	76	51
≥1.5	41.4	82.6	75	47
≥1.0	44.8	60.9	60	51
≥0.5	86.2	26.1	59	40

ranging from 86.2% to 34.5% and specificity between 91.3% and 26.1% (Table 1).

Of the 52 animals studied, only four had positive IGA, all of them belonging to the group case. Comparing the serum GM index in group case as presence or absence of antibodies detected by AGID was no significant difference ($p=0.503$), mean and median values of 2.59 and 1.76 (+/- 2.80), respectively, in animals with positive AGID, and 1.36 and 0.89 (+/- 1.20), respectively, in animals with antibodies to *A. fumigatus*.

4. Discussion

This study evaluated for the first time the applicability of the commercial *Aspergillus* EIA® Platelia kit for the diagnosis of aspergillosis in Magellanic penguins naturally infected, finding no

significant difference in GM ratios between animals with and without the disease. A single study of this population with a similar was described by Cray *et al.* (2009b), however the authors included 56 birds with aspergillosis, of which only three were penguins, it is not possible to extrapolate the test efficacy results obtained by the authors for *Sphenisciformes* family.

In domestic and wild birds this differs families and orders, including some species of raptors, *Psittaciformes*, *Anseriformes* and *Galliniformes*. Described studies regarding the effectiveness of GM detection to diagnosis of aspergillosis, and demonstrate sensitivity rates ranging from 12 to 67% and specificity ranging 73 and 95% using 0.5 as the *cutoff* point (Arca-Ruibal *et al.*, 2006; Cray *et al.*, 2009a, b; Dhama *et al.*, 2013; Franca *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2014).

These results do not match those found in our study with penguins, when considering this same cutoff value was detected high sensitivity rate (86.2%) but low specificity (26.1%). Similar rates of the authors mentioned above were found in our study only using a cutoff point four times (2.0), in this case the sensitivity was 34.5% and specificity of 91.3%.

Factors such as different animals species included in the studies, duration and development of aspergillosis in these birds, as well as clinical presentation of the disease (infection site) and immune response of different species of birds (Deem, 2003; Tell, 2005) may be related to conflicting results found in our study compared to others in the literature.

The high rate of false-positive results found in our study may be related to colonization of the respiratory tract by *Aspergillus* species Fumigati section, exposure to environmental strains or mainly to the presence of a cross-reactive antigen has not been elucidated, which is also suggested by other authors (Le Loch *et al.*, 2005). On the other hand, false negative rates in the Platelia *Aspergillus* EIA® are generally related to encapsulation of the infection, immunocomplex formation by anti-*Aspergillus* antibodies or prior exposure to antifungal agents (for prophylaxis) (Xavier *et al.*, 2011). However, none of these hypotheses can be extrapolated to our study, whereas all penguins with aspergillosis included had lesions spread through the respiratory tract to the *post-mortem* examination, not characterizing frame encapsulation of the infection and were not in antifungal treatment, moreover, no significant difference in the GM results comparing animals with and without antibodies to *Aspergillus* sp. (PKW = 0.449). However, the interference factors in the test for this animal species (penguins) are not well been elucidated, as well as other animals (Arca-Ruibal *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2014).

In attempt to reduce the false-positive rate,

authors recommend testing in at least two serum collections (Arca-Ruibal *et al.*, 2006; Cray *et al.*, 2009a, b; Verweij *et al.*, 1995). In our study, only one clinical sample per animal was included, being this a limitation, in that it was not possible to evaluate the test results when performed as serial monitoring of serum levels of GM penguins.

Our results show that serum GM detection by Platelia *Aspergillus* EIA® does not seem to be useful for the diagnosis of aspergillosis in naturally infected penguins, with high rates of false-positive results with cut-off 0.5 (indicated by the manufacturer) and false negatives in high cut-off.

References

ARCA-RUIBAL, B., WERNERY, U., ZACHARIAH, R., BAILEY, T. A., SOMMA, A., SILVANOSE, C. and MCKINNEY, P., 2006. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *The Veterinary Record*, vol. 158, no. 13, pp. 442-444. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.158.13.442>. PMID:16581995.

BILLEN, F., PEETERS, D., PETERS, I. R., HELPS, C. R., HUYNEN, P., MOL, P., MASSART, L., DAY, M. J. and CLERCX, C., 2009. Comparison of the value of measurement of serum galactomannan and *Aspergillus*-specific antibodies in the diagnosis of canine sino-nasal aspergillosis. *Veterinary Microbiology*, vol. 133, no. 4, pp. 358-365. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.018>. PMID:18768268.

CABANA, A. L. 2013. *Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro*. Pelotas: Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 110 p. Dissertação de Mestrado.

CABANA, A. L., XAVIER, M. O., POESTER, V., KLAFKE, G. B., BRUNO FILHO, P. L., MARTINS, A., SILVA FILHO, R. P. and MEIRELES, M. C. A., 2015. Serological monitoring of antibodies for an early diagnosis of aspergillosis in captive penguins. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 35, no. 6, pp. 573-578. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2015000600015>.

CRAY, C., REAVILL, D., ROMAGNANO, A., VAN SANT, F., CHAMPAGNE, D., STEVENSON, R., ROLFE, V., GRIFFIN, C. and CLUBB, S., 2009a. Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, vol. 23, no. 2, pp. 125- 135. <http://dx.doi.org/10.1647/2007-041.1>. PMID:19673459.

- CRAY, C., WATSON, T., RODRIGUEZ, M. and ARHEART, K. L., 2009b. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 40, no. 1, pp. 64-70. <http://dx.doi.org/10.1638/2007-0138.1>.
- DEEM, S. L., 2003. Fungal diseases of birds of prey. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic animal practice*, vol. 6, no. 2, pp. 363-376. [http://dx.doi.org/10.1016/S1094-9194\(03\)00004-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1094-9194(03)00004-5). PMID:12827728.
- DHAMA, K., CHAKRABORTY, S., VERMA, A. K., TIWARI, R., BARATHIDASAN, R., KUMAR, A. and SINGH, S. D., 2013. Fungal/mycotic diseases of poultry-diagnosis, treatment and control: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, vol. 16, no. 23, pp. 1626-1640. PMID:24506030.
- FISCHER, D., VAN WAEYENBERGHE, L., CRAY, C., GROSS, M., USLEBER, E., PASMANS, F., MARTEL, A. and LIERZ, M., 2014. Comparison of diagnostic tools for the detection of aspergillosis in blood samples of experimentally infected falcons. *Avian Diseases*, vol. 58, no. 4, pp. 587-598. <http://dx.doi.org/10.1637/10831-032714-Reg>. PMID:25619004.
- FRANÇA, M., CRAY, C. and SHIVAPRASAD, H. L., 2012. Serologic testing for aspergillosis in commercial broiler chickens and turkeys. *Avian Diseases*, vol. 56, no. 1, pp. 160-164. <http://dx.doi.org/10.1637/9836-061911-Reg.1>. PMID:22545542.
- GARCIA, M. E., CABALLERO, J., ALVAREZ-PEREZ, S. and BLANCO, J. L., 2008. Seroprevalence of *Aspergillus fumigatus* antibodies in bovine herds with a history of reproductive disorders. *Veterinary Medicine*, vol. 53, no. 3, pp. 117-123. <http://dx.doi.org/10.17221/1939-VETMED>.
- GARCIA, M. E., CABALLERO, M., CRUZADO, M., ANDRINO, M., GONZALEZ-CABO, J. F. and BLANCO, J. L., 2001. The value of the determination of anti-*Aspergillus*IgG in the serodiagnosis of canine aspergillosis: comparison with galactomannan detection. *Journal of Veterinary Medicine*, vol. 48, no. 10, pp. 743-750. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00504.x>. PMID:11846019.
- GUILLOT, J., SARFATI, J., BARROS, M., CADORÉ, J. L., JENSEN, H. E. and CHERMETTE, R., 1999. Comparative study of serological tests for the diagnosis of equine C., *The Veterinary Record*, 2011, v.45, n. 12, pp. 348-349. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.145.12.348>. PMID:10530885.
- JONES, M. P. and OROSZ, S. E., 2000. The diagnosis of aspergillosis in birds. *Journal of Exotic Pet Medicine*, vol. 9, no. 2, pp. 52-58. <http://dx.doi.org/10.1053/AX.2000.4619>.
- LE LOCH, G., DEVILLE, M., RISI, E., BRETAGNE, S. and GUILLOT, J., 2005. Evaluation of the serological test *Platelia Aspergillus* for the diagnosis of aspergillosis. *Proceedings of The 8th European Association of Avian Veterinarians Conference and The 6th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, 24-30 April 2005, Arles, France. Paris: AFVAC, pp. 260-266.
- MAERTENS, J. A., KLONT, R., MASSON, C., THEUNISSEN, K., MEERSSEMAN, W., LAGROU, K., HEINEN, C., CRÉPIN, B., VAN ELDERE, J., TABOURET, M., DONNELLY, J. P. and VERWEIJ, P. E., 2007. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 44, no. 10, pp. 1329-1336. <http://dx.doi.org/10.1086/514349>. PMID:17443470.
- MENNINK-KERSTEN, M. A., DONNELLY, J. P. and VERWEIJ, P. E., 2004. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 4, no. 6, pp. 349-357. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01045-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01045-X). PMID:15172343.
- NUCCI, M., COLOMBO, A. L., 2012. Quando utilizar terapia empírica em doenças fúngicas invasivas? *Rev. Panam. Infectol.*, vol. 14, no. 1, pp. 32-44.
- TELL, L.A., 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Journal of Exotic Pet Medicine*, vol. 43, no. s1, suppl. 1, pp. 71-73. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780400020089>. PMID:16110795.
- VERWEIJ, P.E., STYNEN, D., RIJS, J., PAUW, B.E., HOOGKAMP KORSTANJE, J.A. and MEIS, J.F., 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, no. 7, pp. 1912-1914. PMID:7665670
- XAVIER, M. O., AQUINO, V. R. and SEVERO, L. C., 2011. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, vol. 7, no. 7, pp. 41-50.

XAVIER, M. O., PASQUALOTTO, A. C.,
SOARES, M. P., *et al* 2008. *Aspergillosis in
penguins: gross lesions in 15 cases*. 3rd ed. Miami:
Advances Against Aspergillosis, 132 p.

XAVIER, M. O., SOARES, M. P., MEINERZ, A.
R. M., NOBRE, M. O., OSÓRIO, L. G., SILVA
FILHO, R. P. and MEIRELES, M. C. A., 2007.
Aspergillosis: a limiting factor during recovery of
captive Magellanic penguins. *Brazilian Journal of
Microbiology*, vol. 38, no. 3, pp. 480-484.
[http://dx.doi.org/10.1590/S1517-
83822007000300018](http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000300018)

4.2 Artigo 2

Environmental *A. fumigatus* interference in galactomannan detection test: is this a really cause of false-positive?

Cabana, Ângela Leitzke; Xavier, Melissa Orzechowski; Mendes, Josiara Furtado; Klafke, Gabriel Baracy; Brandolt, Tchana Martinez; Meireles, Mário Carlos Araújo

A ser submetido à revista *Mycoses* como "Short Communication"

Environmental *A. fumigatus* interference in galactomannan detection test: is this a really cause of false-positive?

Cabana, Ângela Leitzke¹; Xavier, Melissa Orzechowski^{2,3}; Mendes, Josiara Furtado¹; Klafke, Gabriel Baracy²; Brandolt, Tchana Martinez²; Meireles, Mário Carlos Araújo¹

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

²Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

³Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, FURG

Summary

Serum Galactomannan (GM) detection by Platelia® *Aspergillus* EIA is a routinely tool to detect invasive fungal infection by *Aspergillus* spp. in neutropenic patients. Thus, its important to recognize and understand the limitations of this test to a better interpretation of it results. Our study aimed to evaluate the lower concentration of *Aspergillus fumigatus* anemophily propagules that could generate a positive GM test. Three serial dilutions of a standardized inoculum from twelve isolates of *A. fumigatus* were tested for GM detection using commercial Platelia® *Aspergillus* EIA. The median conidia concentration required to a positive test was 4.8×10^3 . GM index from those minimal conidia concentrations ranged from 0.519 at the concentration of 1.2×10^3 to 3.57 at the concentration of 1.2×10^6 . Our study shows that a massive contamination, with at least around 500 *A. fumigatus* conidia, is necessary to interfere in the GM detection result causing a false-positive and a possible miss interpretation of the test.

KEY WORDS: *Aspergillus fumigatus*; invasive aspergillosis; false-positive; diagnostic; Platelia® *Aspergillus* EIA.

INTRODUCTION

Galactomannan (GM) is a hydro soluble polysaccharide from the fungi cell wall, considered an important biological marker of invasive fungal infection by *Aspergillus* spp. since it is release occurs especially during the mycelia growth in the process of tissue invasion^{1,2}. Thus, serum GM detection by the sandwich ELISA technique (Platelia® *Aspergillus* EIA) has been routinely used in order to contribute to an early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients^{3,4}. In fact, studies show that if performed serially (at least twice a week) the test is able to anticipate the diagnosis of the disease in up to one week in patients at risk⁵.

However, some limitations of this test are describe, and rates of false negative and false-positive results fluctuate around 10%. False-negatives may be related to encapsulation of the infection, immune complex formation by anti-*Aspergillus* antibodies, or prophylaxis

with antifungals. On the other hand, cross-reactions with other fungal infections and the use of antibiotics with fungal origin such as piperacillin-tazobactam are causes of false positive results ^{2, 3, 6, 7, 8}.

In addition, environmental contamination is also cited as an interference factor in the test and as a possible cause of false positive. Seeing that this interference are subjectively described, there is no data in the literature that can be used to establish whether it is related to a massive contamination or even to a small amount of fungal propagules. Thus, the aim of our study was to evaluate the lower fungal propagules concentration of *A. fumigatus* which promote a positive result in Platelia® *Aspergillus* EIA.

MATERIAL AND METHODS

Twelve isolates of *Aspergillus fumigatus* from the Mycology Laboratory of the Faculty of Medicine (FAMED) of the Federal University of Rio Grande (FURG) were used in the study. They were from cases of aspergillosis in humans (n=3) and in Magellanic penguins (n=3), as well as environmental isolates (n=3), and standard strains (n=3, AF10, AF71 and AF13073) kindly provided by Dr. David Denning, Myconostica, National Aspergillosis Center, UK.

Subcultures of the isolates were carried in potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 48 hours to obtain young colonies. Ten microliter of sterile saline solution (0.85%) added with 200µl of Tween 80 were added to the cultures, and a scraping of the surface of the colonies was carried out to obtain the solution of fungal propagules. After 30 minutes, for sedimentation of the heavier particles, the suspension was filtered using a sterile double layer of gauze to retain the higher particles, ensuring that only conidia remained. This conidial suspension was then adjusted by spectrophotometric reading at 530nm to 80-82% transmittance (0.09 to 0.11 absorbance), and then, a 1:50 dilution in sterile saline solution was performed according to the protocol described by CLSI⁹. Confirmation of the amount of conidia obtained in each inoculum was determined by the "PourPlate" technique, with colony form units/mL counts (CFU/mL).

Three serial dilutions (1:10) of the standardized inoculum were tested for detection of Galactomannan (GM) using commercial Platelia® *Aspergillus* EIA kit, according to manufacturer's instructions. In short, 100µL of Platelia treatment solution (4% ethylenediaminetetraacetic acid solution) was added to 300µL of the adjusted inoculum dilutions (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), homogenized, and heated to 120°C for six min in a heat block, followed by centrifugation at 10,000g for 10min. Next, 50µL of the supernatant and 50µL of

the horseradish peroxidase labeled monoclonal antibody (EBA-2) were incubated in antibody precoated microplates for 90min at 37°C. The plates were washed five times and incubated with 200µL of substrate chromogenic reaction solution for 30±5min in the dark at room temperature. The reaction was stopped with 1.5 N sulfuric acid solution, and the plates were read at an optical density (OD) of 450 nm, with a reference filter of 620/630 nm. Positive, negative, and cut-off controls were incorporate in each assay. GM results were expressed as optical densities (OD), and samples were consider positive when the ratio between the OD observed for the sample and the mean cut-off OD was >0.5, referred as GM index. All experiments were performed in duplicate.

The initial conidial suspension concentration, determined by the Pour-plate was multiplied by the dilution of origin, in order to calculate the lowest concentration of fungal particles able to generate a positive result in the Platelia® *Aspergillus* EIA test, considering the cutoff point 0.5. The data were compiled and the statistical analysis was performed using the SPSS® 20.0 program to the descriptive analyzes and Kruskal-Wallis tests.

RESULTS

Standardization of the inoculums resulted in solutions ranging from 1.6×10^6 to 6.7×10^7 CFU/ml. Considering the volume of inoculum used in each well (300µl) for the test, these values obtained in Pour-plate were multiple by 0.3 and by the corresponding dilution (10^{-1} to 10^{-3}) to obtain the amount of conidia referring to each well tested. Thus, the median conidia concentration required to generate a positive result in the Platelia® *Aspergillus* EIA test was 4.8×10^3 , ranging from 4.8×10^2 to 2×10^6 (Figure 1).

No significant difference was found in the lowest concentration of conidia responsible to a positive result in the test according to the origin of the isolates (kw=0.082), with medians of 3.6×10^3 in human isolates, 6×10^3 in penguins, 1.2×10^3 in environmental and 5.4×10^4 in the standard strains.

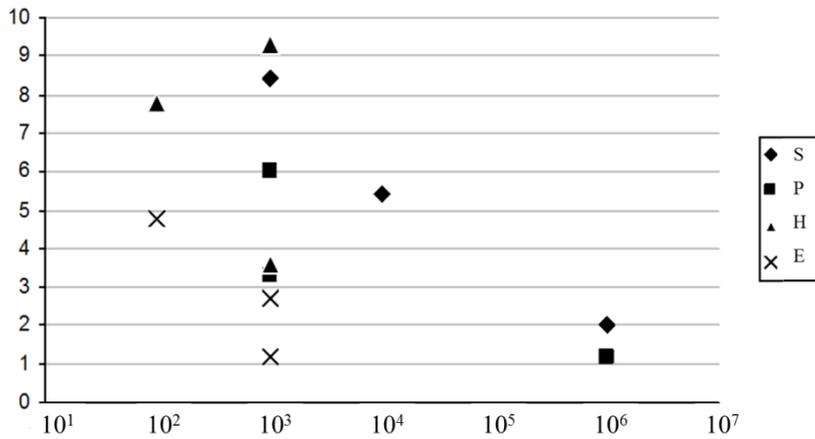


Figure 1: Lowest conidial concentration of *A. fumigatus* responsible for positive results (GM index > 0.5) in Platelia® *Aspergillus* EIA according to their origin (n=12) (S: standard strains; P: strains from aspergillosis in penguins; H: strains from human; E: environmental strains.)

GM index from those minimal conidia concentrations ranged from 0.519 in environmental strain at the concentration of 1.2×10^3 to 3.57 in a strain from penguin aspergillosis at the concentration of 1.2×10^6 (Figure 2).

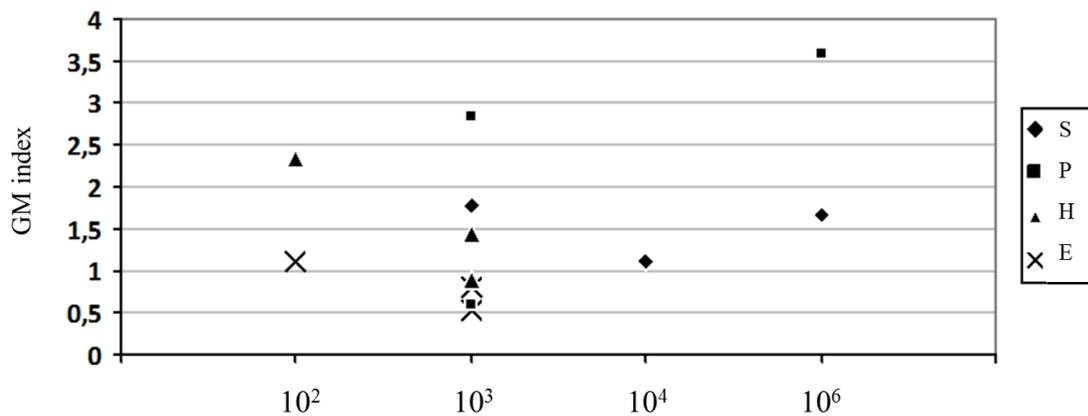


Figure 2: GM index according to the lowest conidial concentration of *A. fumigatus* responsible for positive results in Platelia® *Aspergillus* EIA (n=12) (S: standard strains; P: strains from aspergillosis in penguins; H: strains from human aspergillosis; E: environmental strains.)

DISCUSSION

The interference of environmental contamination in the Platelia® *Aspergillus* EIA test is described by several authors ^{4, 10, 11}. However, the concentration of fungal propagules required for such interference in the test is still unknown. Thus, our study demonstrated in a pioneering way that at least about 500 conidia of *A. fumigatus* are necessary to generate a positive result in the test (GM index above 0.5).

The wide variation in the minima conidia responsible for a positive result, found in our study, could be associated with the variation in speed germination of the different strains, since it is known that hyphae release more GM than conidia ^{10, 11}. Another possibility is associated with the difference in the production of β -D-galactofuranosidase (Galf) by the isolates, which is directly related to GM variability ¹². This difference in GM indexes has already been described in *Aspergillus* such intra species as inter-species, including in the same strains of *A. fumigatus* used in our study ^{2, 4, 13, 14}.

The values of 4.8×10^2 to 2×10^6 conidia found in our study indicate that there is a need of a massive contamination for the interference in the test result, suggesting that environmental contamination by anemophily propagules, which can occur during the execution of the test, does not allow a false-positive result, since it is not common to find this great value of conidia concentration in indoor facilities. On the other hand, if a sample being contaminated at the time of collection, the period until its processing, associated with conditions of transportation and storage (which could be up to 72hs) could allow the germination of the conidia in the samples promoting a greater release of GM and then, possibly resulting in a false-positive test. In fact, Monteiro et al.¹¹ described that a significant change in biochemical variables of the clinical samples used for GM test can occur when kept at room temperature (20-25°C), after a period of 72-96hs, which may impair the quality of the sample to be used for diagnosis, suggesting that it should be processed within the first 24 hours.

The data found in our study contribute to the interpretation of the Platelia® *Aspergillus* EIA results, showing that if the GM test is performed within the first 24 hours after sample collection, adopting all standards suggested by the manufacturer and following the basic laboratory safety standards, the risk of a false-positive result due to environmental contamination is low.

Conflict of interest- Authors declare no conflicts of interest.

References

1. Maertens JA, Klont R, Masson C. et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect. Dis.* 2007. **44**:1329-1336.
2. Xavier MO, Aquino VR, Severo LC, Pasqualotto AC. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. *Rev Bras Oncol Clín.* 2011. **7**:41-50.
3. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopath.* 2007. **163**:191-202.
4. Xavier MO, Araújo JSV, Aquino VR, Severo CB, Guazelli LS, Severo LC, Pasqualotto AC. Variability in galactomannan detection by Platelia® *Aspergillus* EIA according to the *Aspergillus* species. *Rev Inst Med Trop.* Sao Paulo. 2013. **55**(3):145-147.
5. Singh N. Invasive aspergillosis in organ transplant recipients: new issues in epidemiologic characteristics, diagnosis, and management. *Med Mycol.* 2005. **43**:267- 270.
6. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. **27**:245–51.
7. Xavier MO, Pasqualotto AC, Aquino VR. et al. Galactomannan Detection from Piperacillin-Tazobactam Brands Available in the Brazilian Market. *Braz J Infect Dis.* 2009 (a). **13**(5):353-355.
8. Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso JC, Severo LC. Cross-reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus* species in the commercial Platelia® *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*; 2009 (b) **16**:132-3.
9. Clsi. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard- Second Edition. CLSI document M38-A2. *Clin and Lab Stand Instit.* 2008. Wayne, PA. Vol. **28**. n 16.
10. Araújo R & Rodrigues, AG. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *Jour Of Clin Microbiol.* 2004. **42**. n 9:4335-4337.
11. Monteiro AA, Rubenich DS, Zandoná MR, Pasqualotto AC. Impact of pre-analytical variables in the determination of serum galactomannan. *Med Mycol.* In press. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myw123>. 2016
12. Mennink-Kersten MA, Ruegbrink D, Wasei N, Melchers WJG, Verweij PE. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-Dglucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**:1711-8.
13. Mennink-Kersten MA, Ruegbrink D, Klont RR, Verweij PE. Release of galactofuranose antigens by different *Aspergillus* species. In: 45th Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy; Abstract M-153. Washington: Amer Soc for Microbiol. 2005.
14. Cummings JR, Jamison GR, Boudreaux JW, Howles MJ, Walsh TJ, Hayden RT. Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; **59**:113-5

5 Conclusões e Considerações Finais

O índice de GM sérica não diferiu entre os animais do grupo caso e controle ($p_{KW}=0,097$). A partir dos valores determinados pelas coordenadas da curva ROC, quatro diferentes pontos de corte (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0) foram analisados, resultando em taxas de sensibilidade variando de 86,2% a 34,5%, e de especificidade entre 87% e 26,1%. Contudo, a detecção de GM pelo teste de ELISA sanduíche (Platelia *Aspergillus* EIA®) não parece ser útil para o diagnóstico da aspergilose em pinguins, determinando altas taxas de resultados falso-positivo ao considerar o ponto de corte indicado pelo fabricante, ou de falso-negativo quando no uso de ponto de corte mais elevado;

São necessários pelo menos cerca de 500 conídios de *A. fumigatus* para interferir no resultado do Platelia *Aspergillus* EIA®, sendo que a concentração média de conídios necessária para gerar um resultado positivo foi de $4,8 \times 10^3$, o que demonstra que há necessidade de uma contaminação massiva, provavelmente não sendo a contaminação ambiental por propágulos anemófilos responsável por resultados falso positivos no teste;

Embora a menor concentração de conídios capaz de gerar índices de GM $>0,5$ tenha variado de $4,8 \times 10^2$ to 2×10^6 não foi encontrada diferença significativa de acordo com a origem dos isolados testados.

Referências

ABARCA, M. L. 2000. Taxonomy of species involved and identification in the nosocomial aspergillosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, 17:79-84.

ABUNDIS-SANTAMARIA E. **Aspergillosis in birds of prey**. 2003. Available at: <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>> Accessed: 11 aug, 2011.

AGUILAR, R. F.; REDIG, P. T. **Diagnosis and treatment of avian aspergillosis**. In: BONAGURA, J. D.; KIRK, R. (editors). *Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice XII*. Philadelphia: Saunders, 1995.

AINSWORTH, G. C.; AUSTWICK, P. K. C.. Mycotic abortion. In: **Fungal diseases of animals**. 2. ed. England Slough: Commonwealth Agriculture Bureaux, Farnham Royal, 1973.

ANSORG, R.; VAN DEN BOOM, R.; RATH, P. M. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. **Mycoses**, 1997, 40:353-57.

ANSORG, R.; HINTSCHELL VON HEINEGG E., RATH, P. M. *Aspergillus* antigenuria compared with antigenemia in bone marrow transplant recipients. **Eur. Journ. Clin. Microbiol. Infec Dis.**, 1994, 12:497-500.

AQUINO, V. R.; GOLDANI, L. Z.; PASQUALOTTO, A. C. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Mycopath**, 2007, 163:191-202.

AQUINO, V. R.; VERÇOSA, E. B.; FALHAUBER, G.; LUNARDI, L. W.; SILLA, L.; PASQUALOTTO, A.C. Distribution of filamentous fungi causing invasive fungal disease at the haematological Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. **Bras. J. Infect. Dis.**, 2010, 14: 277-80.

ARAÚJO, R.; RODRIGUES, A. G. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. **J. of Clin. Microbiol.**, 2004, 42. n. 9:4335-4337.

ARCA-RUIBAL, B.; WERNERY, U.; ZACHARIAH, R. *et al.* Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. **Vet. Rec.**, 2006, 158 (13):442-444.

ATKINSON, R.; BROJER, C. Unusual presentations of aspergillosis in wild birds. **Proc. Assoc. Avian Vet.**, 1998, 177-181.

- BALAJEE, S. A.; GRIBSKOV, J. L.; HANLEY, E.; NICKLE, D.; MARR, K. A. *Aspergillus lentulus* sp. Nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. **Eukaryotic Cell** 2005, 4 (3):625.
- BAUCK, L. Mycoses. *In*: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J., HARRISON, L. R. **Avian Medicine: principles and application**. Florida: Wingers Publishing, 1994, 997-1006.
- BILLEN, F., PEETERS, D., PETERS, I. R. *et al.* Comparison of the value of measurement of serum galactomannan and *Aspergillus*-specific antibodies in the diagnosis of canine sino-nasal aspergillosis. **Vet Microbiol.**, 2009,133:358-365.
- BLANCO, J. L.; GUEDEJA-MARRÓN, J.; CABALLERO, J.; GARCÍA, M. E. Aspergillosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 10-15, 1998.
- BULPA, P.; DIVE, A.; SIBILLE, Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Eur. Respir. J.**, 2007, 30:782-800
- BURCO, J. D., ZICCARDI, M. H., CLEMONS, K. V.; TELL, L. A. 2012. Evaluation of plasma (1→3) β-D-glucan concentrations in birds naturally and experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. **Avian Dis**, 56:183-191.
- CABANA, A. L. **Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro**. 110f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas/RS. 2013.
- CABANA, A. L., XAVIER, M. O., POESTER, V. *et al.* Serological monitoring of antibodies to an early diagnosis of aspergillosis in captive penguins. **Pesq. Vet. Bras.**, 2015, 35(6): June, 573-578.
- CAILLOT, D.; CASASNOVAS, O.; BERNARD, A.; COUAILLIER, J. F. ; DURAND, C.; CUISENIER, B. *et al.* Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. **J. Clin. Oncol.**, 1997, 15:139-47
- CAMELI-ROJAS, V.; MATA-ESSAYAG, S.; DE CAPRILES, C. H; MAGALDI, S.; DE PEREZ, E.G.; GARRIDO, L.; BALDERRAMA-CABALLERO, D. *Aspergillus* species in patients with chronic rhinosinusitis. **Mycoses**, 2004, 47, 47-49.
- CARRASCO, L.; LIMA, J. R. J. S.; HALFEN, D. C.; SALGUERO, F. J.; SANCHEZ-CORDÓN, P.; BECKER, G. Systemic Aspergillosis in Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine**, 2001, 48:551-554.
- CARVALHO-DIAS, V. M.; SOLA, C. B.; CUNHA, C. A.; SHIMAKURA, S. E.; PASQUINI, R.; QUEIROZ-TELLES, F. Invasive aspergillosis in hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective analysis. **Braz. J. Infect. Dis.**, 2008, 12:385-

- CAVALLO, M., ANDREONI, S., MARTINOTTI, M. G. *et al.* Monitoring environmental *Aspergillus* spp. contamination and meteorological factors in a haematological unit. **Mycopathologia**, 2013, 176(5-6):387-394.
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard- Second Edition. CLSI document M38-A2. **Clin. and Lab. Stand Instit.**, Wayne, PA, 2008, v. 28, n. 16.
- CRAY, C.; WATSON, T.; RODRIGUEZ, M. *et al.* Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. **J. Zoo Wild Med.**, 2009 (a), 40:64-70.
- CRAY, C.; REAVILL, D.; ROMAGNANO, C. A. *et al.* Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. **J. Avian Med. Surg.**, 2009 (b), 23:125-135.
- CUMMINGS JR.; JAMISON, G. R.; BOUDREAUX, J. W.; HOWLES, M. J.; WALSH, T. J.; HAYDEN, R. T. Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 2007, 59:113-5.
- DEAK, E.; BALAJEE, S. A. **Molecular methods for identification os *Aspergillus* species.** *In: Aspergillosis: from diagnosis to prevention.* PASQUALOTTO, A.C. USA: Ed. Springer, 2010, p. 75-83.
- DEEM, S. L. Fungal diseases of birds of prey. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, 2003, 6:363-376.
- DENNING, D. Introduction. *In: Aspergillosis: form diagnosis to prevention.* PASQUALOTTO, A. C. USA: Springer, 2010, p.3-5
- DHAMA, K.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A. K. *et al.* Fungal/Mycotic diseases of poultry diagnosis, treatment and control: A review. **Pakistan Jour.of boil. Scien.**, 2013, 16 (23):1626-1640.
- EGGERT, M. J.; ROMBERG, P. F. 1960. Pulmonary aspergillosis in a calf. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 137:595-596.
- EINSELE, H. K.; QUABECK, K. D.; MULLER, H.; HEBART, I.; ROTHENHOFER, J.; LOFFLER; SCHAEFER, U. W. 1998. Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonization of lower respiratory tract before marrow transplantation. **Lancet** 352(9138):1443.
- EL-KHOULY, A.; GADIR, F. A.; CLUER, D. D.; MANEFIELD, G. W. 1992. Aspergillosis in camels affected with a specific respiratory and enteric syndrome. **Australian Veterinary Journal**, 69:182-186.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **Plos Pathogens**, 2012, v8 I4. e1002585

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39:783-791.

FISCHER, D.; VAN WAEYENBERGUE, L.; CRAY, C. *et al.* Comparison of diagnostic tools for the detection of Aspergillosis in blood samples of experimentally infected falcons. **Av. Dis.**, 2014, 58:587-598.

FORBES, N. A. Aspergillosis in raptors. **Vet. Rec.**, 1991, 128 (11):263.

FORBES, N. A. Rapaces. *In*: BEYNON, P. H.; COOPER, J. E. (editors). **Manual de animales exóticos**. España: Harcourt Brace, 1999.

FRANÇA, M.; CRAY, C.; SHIVAPRASAD, H. L. Serologic testing for Aspergillosis in commercial Broiler Chickens and Turkeys. **Av. Dis**, 2012, 56:160-164.

FRIEND, M.; FRANSON, J. **Field manual of wildlife diseases**: general field procedures and diseases of birds. USA: Geological Survey, 1999.

GALAGAN, J. E; CALVO, S. E; CUOMO, C. *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, 2005, 438:1105-1115.

GALLIEN, S.; FOURNIER, S.; PORCHER, R.; BOTTERO, J.; RIBAUD, P.; SULAHIAN, A. *et al.* Therapeutic outcome and prognostic factors of invasive aspergillosis in a infectious diseases departmente: a review of 34 cases. **Infection**, 2008, 36:533-8

GANDINI, P.; BOERSMA, P. D.; FRERE, E.; GANDINI, M.; HOLIK, T.; LICHTSCHEIN, V. Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of Chubut, Argentina. **The Auk**, 1994, 111(1):20-27.

GAVA, M. A. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. 2002. 65fl. Mestrado (Dissertação) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba/SP.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REBSTOCK, G. A.; GRIOT, K.; HEREDIA, S. R.; ADORNES, A. C.; SILVA, R. P. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, 2006, 52:193-198.

GARCIA, M. E.; CABALLERO, M.; CRUZADO, M., *et al.* The value of the determination of anti-*Aspergillus* IgG in the serodiagnosis of canine aspergillosis: Comparison with galactomannan detection. **J. Vet. Med.**, 2001, 48:743-750.

GARCIA, M. E.; CABALLERO, J.; ALVAREZ-BLANCO, S. *et al.* Seroprevalence of *Aspergillus fumigatus* antibodies in bovine herds with a history of reproductive disorders. **J. Vet. Med.**, 2008, 53 (3):117-123.

- GEISER, D. M.; FRISRAD, J. C.; TAYLOR, J. W. Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial beta-tubulin and hydrophobin DNA sequences. 1998. **Mycologia**, 90:831-845.
- GERMAN, A. C.; SHANKLAN, G. S.; EDWARDS, J.; FLACH, E. J. Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. 2002. **Vet. Rec.**, 150:513-518.
- GRACZYK, T. K.; COCKREM, J. F. *Aspergillus* spp. seropositivity in New Zealand penguins. **Mycopathologia**.1995, 131:179-184.
- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. Maternal transfer of anti-*Aspergillus* spp. Immunoglobulins in African Black-footed Penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Wildlife Diseases**, 1995, 31(4):545-549.
- GRACZYK, T. L.; CRANFIELD, M. R.; KLEIN P. N. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive Aspergillosis. 1998. **Mycopath**, 140:121-127.
- GRIFFIN, R. M. Pulmonary aspergillosis in the calf. 1969. **Veterinary Record**, 84: 109-111.
- GUILLOT, J.; SARFATI, J., DE BARROS, M. *et al.* Comparative study of serological tests for the diagnosis of equine aspergillosis. **Vet. Rec.**, 1999, 145:348-349.
- HEIDENREICH, M. **Birds of prey: medicine and management**. Malden MA: Blackwell Science, 1997.
- HERBRECHT, R.; NATARAJAN-AME, S.; LETSCHER-BRU, V.; CANUET, M. (2004). Invasive pulmonary aspergillosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, 25(2):191-202.
- 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. **J. Clin. pathol.**, 1995, 48:210-3
- JONES, M. R.; OROSZ, S. E. The diagnosis of aspergillosis in birds. **Sem. Av. Exot. Pet. Med.**, 2000, 9:52-58.
- JORDAN, F. T.; PATTISON, M. **Poultry diseases**. 4th ed. London: Saunders, 1997.
- KANO, R.; SHIBAHASHI, A.; FUJINO, Y.; SAKAI, H.; MORI, T.; TSUJIMOTO, G.; YANAI, T.; HASEGAWA, A. Two cases of feline orbital aspergillosis due to *Aspergillus udagawae* and *A. viridinutans*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2012, 31, 75(1):7-10.
- KATZ, M. E.; DOUGALL, A. M.; WEEKS, K.; CHEETHAM, B. F. Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*.. **J. Clin. Microbiol.**, 2005, 43:551-555.

KOICHI, M.; MICHIIHIRO, T. Serological test for diagnosis of pulmonary Aspergillosis in penguins by detecting Galactomannan. **Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 1996, 1(2):105-108.

KONTOYIANNIS, D. P.; BODEY, G. P. Invasive aspergillosis in 2002: an update. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 2002, 21:161-72.

KOZAKIEWICZ, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. **Mycol. Pap.**, 161, 1^188.

KHOSRAVI, A. R., SHOKRI, H., ZIGLARI, T. *et al.* Outbreak of severe disseminated aspergillosis in a flock of ostrich (*Strutio camelus*). **Mycos.**, 2008, 51:557-559.

KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Utrecht: Central Bureauvoor Schimmel cultures, 2002.

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

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. Lacaz: Ed. Sarvier, 2002.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 1999, v. 12, n. 2, p. 310-350.

LATGÉ, J. P. Thepathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **TRENDS in Microbiology**, 2001, v. 9, n. 8, p. 382-389.

LATGÉ, J. P.; CALDERONE, R. Host-microbe interations: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2002, v.5, p 355-358.

LE LOC'H, G.; DEVILLE, M.; RISI, E.; *et al.* Evaluation of the serological test Platelia *Aspergillus* for the diagnosis of aspergillosis. **Proc. Eur. Assoc. Avian Vet.**, 2005, 260-266.

LEWIS, R. E.; WIEDERHOLD, N. P.; CHI, J.; HAN, X. Y.; KOMANDURI, K. V.; KONTOYIANNIS, D. P.; PRINCE, R. A. Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. **Infection and Immunity**, 2005, v.73, n.1, p.635-637.

MAERTENS, J. A.; VERHAEGEN, J.; DEMUYNK, H. *et al.* Autopsy- controlled prospective evaluation of serial screening for circulation galactomannan by a sandwich enzyme- linked immunosorbent assay for haematological patients at risk for invasive aspergillosis. **J. Clin. Microbiol.**, 1999, 37:3223-3228.

MAERTENS, J. A.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K., VAN ELDERE, J.; BOOGAERTS, M. 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**, 2001, 97: p. 1604-1610.

- MAERTENS, J. A.; KLONT, R.; MASSON, C. *et al.* Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. **Clin. Infect. Dis.**, 2007, 44:1329-1336.
- MAERTENS, J.; THEUNISSEN, K.; LAGROU, K. Galactomannan testing. *In*: PASQUALOTTO, A. C. **Aspergillosis from diagnosis to prevention**. USA: Springer, 2010, p. 105-124.
- MARR, K. A.; PATTERSON, T.; DENNING, D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, 2002, Dec., 16:875-94.
- MENNINK-KERSTEN, M. A.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. **Lancet Infect. Dis.**, 2004, 4:349-357.
- MENNINK-KERSTEN, M. A.; RUEGBRINK, D.; KLONT, R.R.; VERWEIJ, P. E. **Release of galactofuranose antigens by different *Aspergillus* species**. *In*: 45th Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy; Abstract M-153. Washington: Amer Soc for Microbiol, 2005.
- MENNINK-KERSTEN, M. A.; RUEGBRINK, D.; WASEI, N.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. *In vitro* release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-Dglucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. **J. Clin. Microbiol.**, 2006, 44:1711-8.
- MITCHELL, C. G; SLIGHT, J.; DONALDSON, K. Diffusible component from the spore surface of the fungus *Aspergillus fumigatus* which inhibits the macrophage oxidative burst is distinct from gliotoxin and other hyphal toxins. **Thorax**, 1997, 52:796-801.
- MONTEROS, E.; CARRASCO, L.; KING, J. M.; JENSEN, H. E. Nasal zygomycosis and pulmonary aspergillosis in an American bison. **Journal of Wildlife Diseases**, 1999, 35(4), p. 790-795.
- MONTEIRO, A. A.; RUBENICH, D. S.; ZANDONÁ, M. R.; PASQUALOTTO, A. C. Impact of pre-analytical variables in the determination of serum galactomannan. **Med. Mycol.**, 2016. In press. DOI: <<https://doi.org/10.1093/mmy/myw123>>.
- MOWAT, C.; WILLIAMS, B.; JONES, S.; McCHELERY, M.; RAMAGE, G. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm?, **Med. Mycol.**, 2009, v. 47, Suppl 1, n. Supplement I, p. S120-S126.
- NIERMAN, W. C.; PAIN, A.; ANDERSON, M. J. *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, 2005, 438:1151-1156.
- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Quando utilizar terapia empírica em doenças fúngicas invasivas? **Rev. Panam. Infectol.**, 2012, 14(1):32-44.

PAGANO, L.; CAIRA, M.; NOSARI, A. *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.**, 2007, 45:1161-1170.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. Diagnosis of invasive fungal infections – current limitations of classical and new diagnostic methods. **Business Briefing: Eur. Oncol. Rev.**, 2005, p. 1-5.

PASQUALOTTO, A. C.; XAVIER, M. O.; SANCHEZ, L. B. *et al.* Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipients by Detection of Galactomannan in the Bronchoalveolar Lavage Fluid. **Transplantation**, 2010, (90):306-11.

PAUW, B. D.; WALSH, T. J.; DONNELLY, J. P.; STEVENS, D. A; EDWARDS, J. E; CALANDRA, T. *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. **Clin. Infect. Dis.**, 2008, 46:1813-21.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med. Mycol.**, 2007, 45:321-46.

PETERSON, S. W.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C. Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. In: VARGA, J., SAMSON, R. A. (eds.) Wageningen: **Wageningen Academic Publishers**, 2008, 33-56.

PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, 2001, 93:689-703.

PFEIFFER, C. D.; FINE, J. P.; SAFDAR, N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta- analysis. **Clin. Infect. Dis.**, 2006, 42(10):1417-27.

PICKETT, J. P.; MOORE, C. P.; BEEHLER, B. A.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; DUBIELZIG, R. R. Bilateral chorioretinitis secondary to disseminated aspergillosis in an alpaca. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 1985, 187: 1241-1243.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994.

RAJA, N. S.; SINGH, N. N. Disseminated invasive aspergillosis in an apparently immunocompetent host. **J Microbiol Immunol Infect.**, 2006, 39(1):73-7.

RAMÍREZ, L. J.; CHÁVEZ, S. L.; VELASCO, G. **Reporte de un caso de aspergilosis en un ave búho cornudo (*Pseudocops clamator*) en el zoológico Miguel Alvarez del Toro, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas**. Memorias del XIX Simposio Sobre Fauna Silvestre, Gral. MV Manuel Cabrera Valtierra, noviembre 2002, 27-29; México.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.

REDIG, P. T. **Fungal diseases**. *In*: SAMOUR, J. (editor). London: Avian medicine; Mosby. 2000.

REDIG, P. T. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. *In*: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine: current therapy 3**. Denver, Colorado: W. B. Saunders Inc., 1993. p. 178-181.

REDIG, P. T. Mycotic infections of birds of prey. *In*: FOWLER, M. E. (editor). **Zoo and wild animal medicine**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders. 1986.

RICHARD, J. L. Aspergillosis. *In*: CALNEK, B. W. (editor). **Diseases of poultry**. 10th ed. Iowa: Iowa State University Press, 1997.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J Antimicrob Chemother**, 2005, 56:5-11.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection diagnosis and management**. 3th ed. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd. 2003. 161:1-188.

ROSSKOPF, W.; WOERPEL, R. **Diseases of cage and aviary birds**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997.

SEVERO, L. C.; BOHRER, J. C.; GEYER, G. R.; FERREIRO, L. Invasive aspergillosis in an alpaca (*Lamos pacos*). **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 1989, 27:193-195.

SEYEDMOUSAVI, S.; GUILLOT, J.; ARNE, P.; DE HOOG, G. S.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. **Medical Mycology**, 2015, 53, 765-797.

SHARP, N. J. H.; BURRELL, M. H.; SULLIVAN, M. *et al*. Canine nasal aspergillosis: serology and treatment with ketoconazole. **Journal of Small Animal Practice**, 1984, 25:149-158.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **Br. J. Haematol.**, 2005, 129:569.

SLAVIN, M.; FASTENAU, J.; SUKAROM, I.; MAVROS, P.; CROWLEY, S.; GERTH, W. C. Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. **Int. J. Infect. Dis.**, 2004, 8:111-20.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **J. Chromatogr. A.**, 1997, 760:264-270.

- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- SINGH, N. Invasive aspergillosis in organ transplant recipients: new issues in epidemiologic characteristics, diagnosis, and management. **Med. Mycol.**, 2005, 43:267-270.
- STEVENS, D. A.; KAN, V. L.; JUDSON, M. A.; MORRISON, V. A.; DUMMER, S.; STONE W. B.; OKONIEWSKI, J. C. Necropsy findings and environmental contaminants in common loons from New York. **J Wildl Dis.**, 2001, 37 (1):178-184.
- TEKAIA, F.; LATGÉ, J. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Cur. Opin. Microbiol.**, 2005,v.8, p. 1-8.
- TELL, L. A. Aspergillosis in mammals and birds: Impact on veterinary medicine. **Med. Micol.**, 2005, 43:71-73.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- VARGA, J.; VIDA, Z.; TOTH, B.; DEBETS, F.; HORIE, Y. **Phylogenetic analysis of newly described *Neosartorya* species**. *Antonie Leeuwenhoek*, 2000, 77:235-239.
- VERWEIJ, P. E.; STYNEN, D.; RIJS, J. *et al.* Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Journ. of Clin. Microb.**, 1995, 33, 1912-1914.
- VILA, T. T.; ROZENTAL, S. **Biofilm formation as a pathogenicity factor of medically important fungi**. Chapter 1, 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/62768>.
- WALSH, T. J. V.; PETRAITIS, R.; PETRAITIENE, A.; FIELD-RIDLEY, D.; SUTTON, M.; GHANNOUM, T.; SEIN, R.; SCHAUFELE, J.; PETER, J.; BACHER, H.; CASLER, D.; ARMSTRONG, A.; ESPINEL-INGROFF, M.; RINALDI, G.; LYMAN, C. A. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin. **B. J. Infect. Dis.**, 2003, 188:305-319.
- WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. **Fungal infections in the immunocompromised host**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2000. v.95, supl.1, p.153-158.
- WHEAT, L. J., WALSH, T. J. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 2008, 27:245-51.
- XAVIER, M. O.; SOARES, M. P.; MEINERZ, A. R. M. *et al.* Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. **Braz. Jour. of Microb.**, 2007, 38:480-484.

- XAVIER, M. O.; PASQUALOTTO, A.C.; SOARES, M. P. *et al.* **Aspergillosis in penguins: gross lesions in 15 cases.** 3rd. Miami, Florida, USA: Adv. Ag. Asp, 2008.
- XAVIER, M. O; FARIA, R. O. Aspergilose. *In*: MEIRELES, Mário Carlos Araújo; NASCENTE, Patrícia da Silva. (Org.). **Micologia veterinária.** Pelotas: Ed. Universitária UFPel, 2009. p. 205-223.
- XAVIER, M. O.; PASQUALOTTO, A. C.; AQUINO, V. R. *et al.* Galactomannan Detection from Piperacillin-Tazobactam brands available in the brazilian market. **Braz. J. Infect. Dis.**, 2009 (a), 13(5):353-355.
- XAVIER, M. O.; PASQUALOTTO, A. C.; CARDOSO, J. C.; SEVERO, L. C. Cross-reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus* species in the commercial Platelia® *Aspergillus* enzyme immunoassay. **Clin. Vaccine Immunol.**, 2009 (b), 16:132-3.
- XAVIER, M. O.; AQUINO, V. R.; SEVERO, L. C.; PASQUALOTTO, A. C. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. **Rev. Bras. Oncol. Clín.**, 2011, 7:41-50.
- XAVIER, M. O.; ARAÚJO, J. S. V.; AQUINO, V. R.; SEVERO, C. B.; GUAZELLI, L. S.; SEVERO, L. C.; PASQUALOTTO, A. C. Variability in galactomannan detection by Platelia® *Aspergillus* EIA according to the *Aspergillus* species. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 2013, Sao Paulo, 55(3):145-147.
- YAMAZAKI, T.; KUME, H.; MURASE, S.; YAMASHITA, E.; ARUSAWA, M. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in anual of the pathological autopsy cases in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, 1999, 37:1732-8.
- YOUNG, E. A.; CORNISH, T. E.; LITTLE, S. E. Concomitant mycotic and verminous pneumonia in a blue jay from Georgia, **J. Wildl. Dis.**, 1998, 34 (3):625-628.

