

# Produção e caracterização de exoantígenos para diagnóstico de aspergilose

Fabiane Jamono Vieira<sup>1</sup>, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia<sup>1,2</sup>, Alicia Arechavala<sup>3</sup>, Charley Christian Staats<sup>4</sup>, Andressa Grazziotin Mondadori<sup>1</sup>, Julia Medeiros Sorrentino<sup>1</sup>, Luana Kammler<sup>4</sup>, Cibele Massotti Magagnin<sup>1</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>4</sup>, Ricardo Negroni<sup>3</sup>, Maria Lúcia Scroferneker<sup>1,2</sup>

1-Laboratório de Fungos Patogênicos, Departamento de Microbiologia, ICBS, UFRGS, Brasil.

2- Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS,

3- Unidade de Micologia, Hospital de Doenças Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina.

4- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Introdução

Aspergilose é uma doença fúngica oportunística que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. O diagnóstico desta doença se torna difícil, pois os métodos conhecidos são pouco sensíveis e específicos, fazendo com que o tratamento adequado seja aplicado tardiamente.

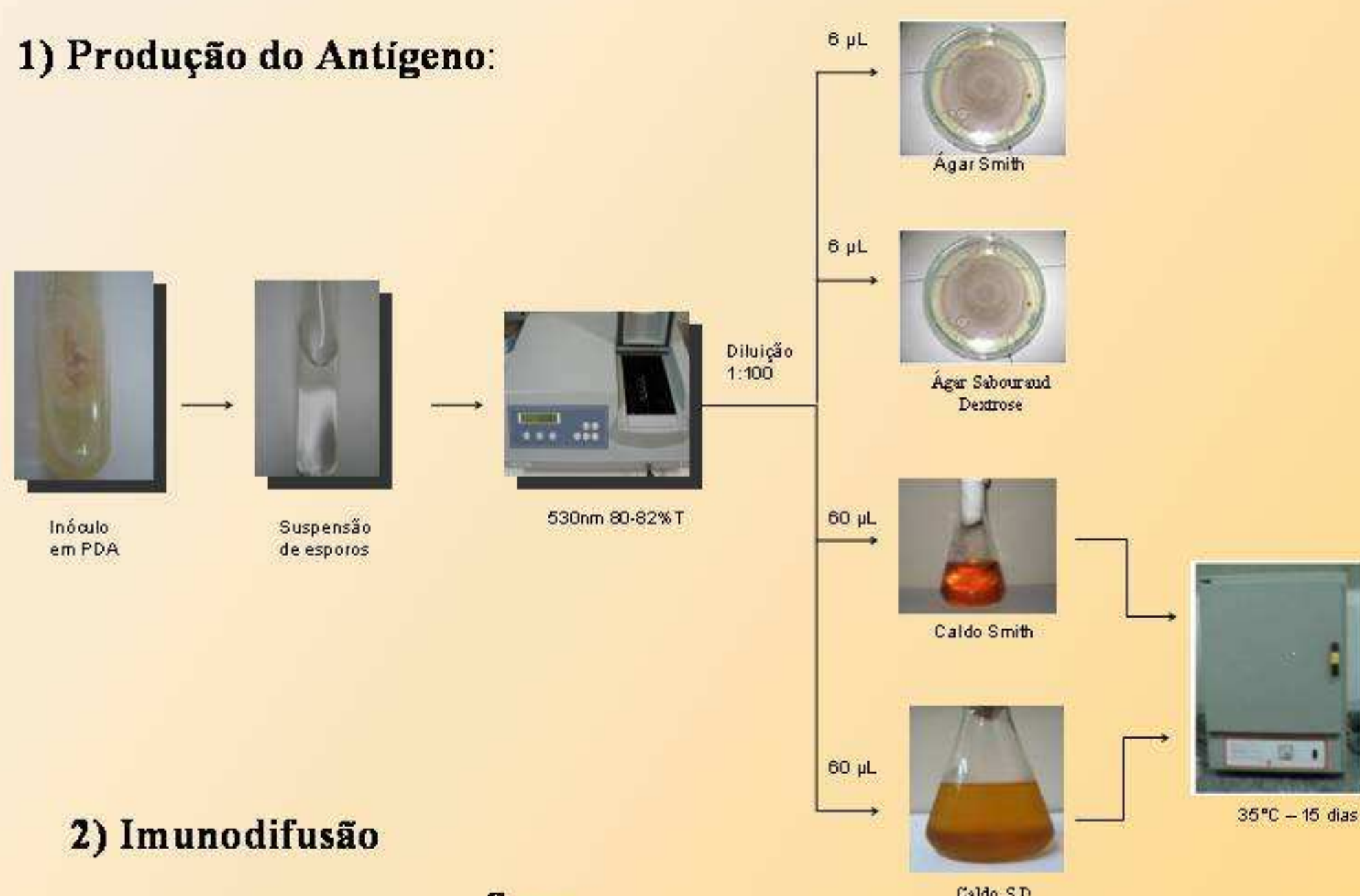
## Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de antígenos para diagnóstico de aspergilose.

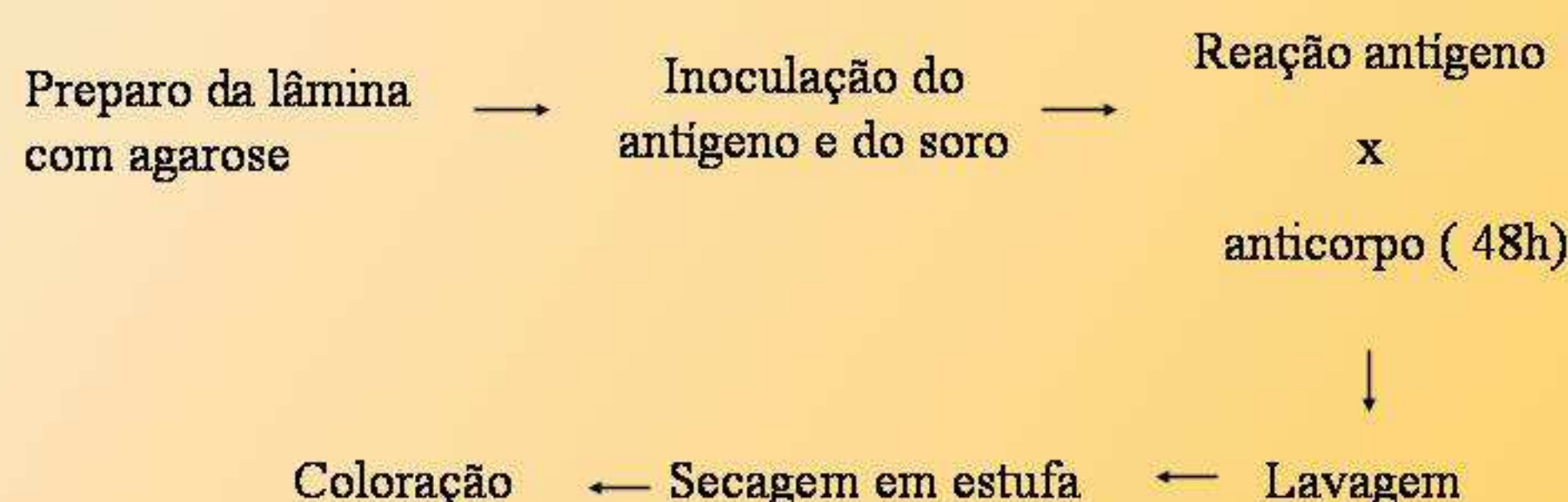
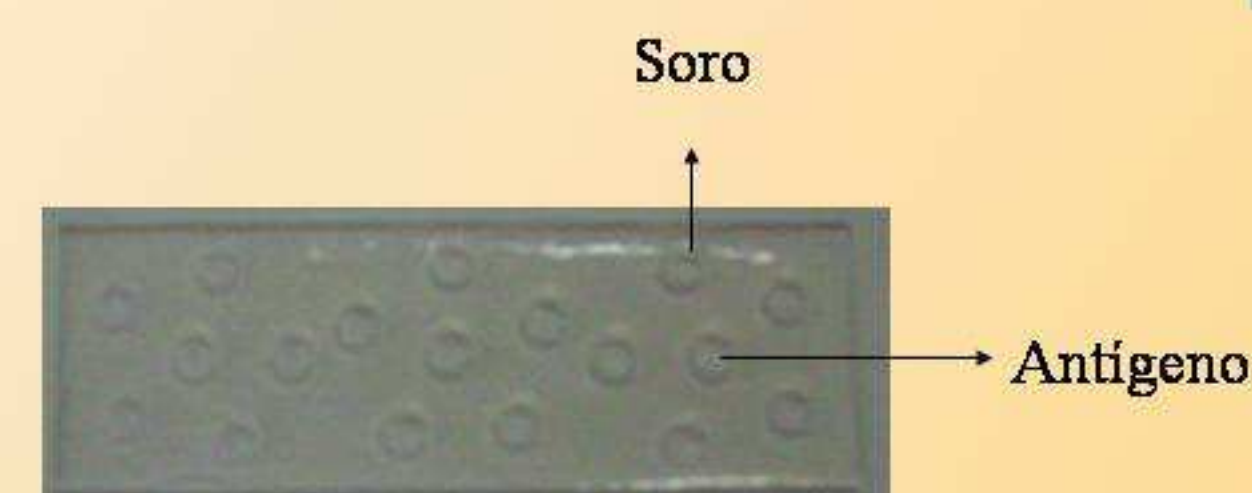
## Materiais e métodos

Os microrganismos utilizados foram *Aspergillus fumigatus* (MG 2, HCPA e ATCC 16913), *Aspergillus flavus* (HCPA, MG e F58), *Aspergillus terreus* (1, HCPA 1 e CMMI 233-3) e *Aspergillus niger* (HCPA, MG e 19899), os quais foram cultivados em caldo Smith (SM) e caldo Sabouraud (SB) e incubados a 37°C por 15 dias. Após o cultivo foi filtrado, dialisado e liofilizado. Os exoantígenos produzidos foram testados por imunodifusão frente a 69 soros de pacientes com micoses sistêmicas (29 com aspergilose, 20 com histoplasmose e 20 com paracoccidiodomicose). Além disso, foram utilizados 120 soros de pacientes neutropênicos, submetidos a Transplante de Medula Óssea (TMO), coletados em 3 momentos distintos. Aliquotas dos extratos protéicos foram quantificadas empregando o sistema Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*). Os perfis protéicos foram analisados por SDS-PAGE utilizando 100 µg de proteínas. Alternativamente, proteínas foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (GE Biosciences) utilizando o sistema *Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) segundo recomendações do fabricante. A identificação das proteínas reconhecidas pelos anticorpos foi realizada por espectrometria de massas. Todos os soros foram submetidos a um ensaio imunoenzimático tipo sanduíche para detecção do antígeno galactomanana de *Aspergillus* utilizando o kit comercial *Platelia® Aspergillus EIA* (Bio-Rad). Concomitantemente, os antígenos produzidos foram analisados usando um espectrômetro de massa ESI-MS/MS acoplado a um cromatógrafo.

### 1) Produção do Antígeno:



### 2) Imunodifusão



## Resultados

De todos os antígenos produzidos, os mais reativos foram *A. fumigatus* MG2 SB e *pool A. fumigatus* SB para soros de *A. fumigatus*; *pool* total SM, *pool* total SB e *A. niger* HCPA SM para soros de *A. niger* e *A. flavus* F58 SM para soros de *A. flavus*. No entanto, para os soros de pacientes neutropênicos, os antígenos produzidos não foram reativos. Até o presente momento foram caracterizadas duas proteínas: β-glicosidase para *A. fumigatus* e α-amilase para *A. niger*. Para *A. flavus* ainda não foi possível caracterizar a proteína responsável pela atividade.

Tabela 1: Relação de títulos para antígenos reativos contra soros de aspergilose, através da técnica de imunodifusão dupla.

| Soros                      | Antígenos        |                |                               |                             |                              |                            |                            |                             |                           |                              |
|----------------------------|------------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
|                            | Pool total Smith | Pool total Sab | <i>A. fumigatus</i> 16913 Sab | <i>A. fumigatus</i> MG2 Sab | Pool <i>A. fumigatus</i> Sab | <i>A. niger</i> HCPA Smith | <i>A. flavus</i> F58 Smith | Pool <i>A. flavus</i> Smith | Pool <i>A. flavus</i> Sab | <i>A. terreus</i> HCPA Smith |
| <i>A. fumigatus</i> (n=24) |                  |                |                               |                             |                              |                            |                            |                             |                           |                              |
| A2                         |                  |                |                               | 1:2                         | 1:2                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| A4                         |                  |                | 1:2                           | 1:2                         | 1:2                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| A6                         |                  |                | 1:4                           |                             | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| A8                         |                  |                |                               | 1:8                         | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 134                        |                  |                |                               | 1:4                         | 1:4                          |                            |                            |                             |                           | 1:1                          |
| 135                        |                  |                | 1:4                           | 1:16                        | 1:16                         |                            |                            |                             |                           |                              |
| 136                        |                  |                | 1:4                           | 1:16                        | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 153                        |                  |                |                               | 1:1                         | 1:1                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 187510                     |                  |                | 1:8                           | 1:8                         | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 189118                     |                  |                |                               | 1:4                         | 1:1                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 194206                     |                  |                |                               | 1:4                         | 1:4                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 199283                     |                  |                | 1:4                           | 1:16                        | 1:16                         |                            |                            |                             |                           |                              |
| 200134                     |                  |                |                               | 1:2                         | 1:2                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 202484                     |                  |                | 1:4                           | 1:8                         | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 206438                     |                  |                | 1:16                          | 1:16                        | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 207775                     |                  |                | 1:2                           | 1:8                         | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 208036                     |                  |                | 1:4                           | 1:8                         | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 208541                     |                  |                |                               | 1:2                         | 1:1                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 211888                     |                  |                |                               | 1:2                         | 1:2                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 212059                     |                  |                | 1:2                           | 1:4                         | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 212193                     |                  |                |                               | 1:16                        | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 212220                     |                  |                |                               | 1:16                        | 1:2                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 212478                     |                  |                | 1:8                           | 1:4                         | 1:4                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| 212581                     |                  |                | 1:8                           | 1:8                         | 1:8                          |                            |                            |                             |                           |                              |
| <i>A. niger</i> (n=2)      |                  |                |                               |                             |                              |                            |                            |                             |                           |                              |
| 132219                     | 1:2              | 1:16           |                               |                             |                              | 1:2                        |                            |                             |                           |                              |
| 160899                     | 1:2              | 1:16           |                               |                             |                              | 1:2                        |                            |                             |                           |                              |
| <i>A. flavus</i> (n=3)     |                  |                |                               |                             |                              |                            |                            |                             |                           |                              |
| 138                        |                  |                |                               |                             | 1:2                          |                            | 1:8                        | 1:2                         | 1:4                       | 1:1                          |
| 546                        |                  |                |                               |                             |                              |                            | 1:8                        | 1:1                         | 1:4                       |                              |
| 107852                     |                  |                |                               |                             |                              |                            | 1:4                        | 1:1                         | 1:2                       |                              |



Figura 1: Avaliação da reatividade de soros contra antígenos de diferentes espécies de *Aspergillus*.

Tabela 2: Números de soros analisados para cada micose e a quantidade de soros que apresentaram resultado positivo no ensaio imunoenzimático para detecção do antígeno de galactomanana.

| Micose               | Nº de soros analisados | Nº de soros reativos |
|----------------------|------------------------|----------------------|
| Aspergilose          | 29                     | 29                   |
| Histoplasmose        | 20                     | 18                   |
| Paracoccidiodomicose | 20                     | 13                   |

## Conclusão

Os antígenos sob investigação possuem bom potencial imunológico para o diagnóstico da aspergilose. No entanto, os antígenos produzidos não foram reativos frente a soros de pacientes neutropênicos. Assim proteínas responsáveis pela atividade antigênica podem ser, futuramente, alvo de estudos para serem utilizadas isoladamente e possibilitarem um diagnóstico mais preciso e precoce da aspergilose.

## Agradecimentos

