

Carta ao Editor / Letter to Editor

## Detecção de *Aspergillus sp* pela técnica de PCR-nested em pacientes submetidos a transplante de medula óssea

### *Detection of Aspergillus sp in bone marrow transplant patients by PCR-nested technique*

Marcia C. Z. Novaretti<sup>1</sup>

Azulamara S. Ruiz<sup>2</sup>

Frederico L. Dulley<sup>3</sup>

Pedro E. Dorlhiac-Llacer<sup>4</sup>

Dalton A. F. Chamone<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutora em Hematologia pela Faculdade de Medicina da USP. Chefe da Divisão de Imunematologia da Fundação Pró-sangue Hemocentro São Paulo.

<sup>2</sup>Mestre em Ciências pela Unifesp. Biomédica da Divisão de Imunohematologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

<sup>3</sup>Professor Livre-Docente em Hematologia pela Faculdade de Medicina da USP. Chefe da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da FMUSP.

<sup>4</sup>Professor Livre-Docente em Hematologia pela Faculdade de Medicina da USP. Chefe da Onco-Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Diretor Técnico da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

<sup>5</sup>Professor Titular de Hematologia da Faculdade de Medicina da USP. Presidente, Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

Disciplina de Hematologia – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. Divisão de Imunohematologia, Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo

#### Senhor Editor,

Nos últimos anos tem sido crescente a incidência de infecção fúngica por *Aspergillus* em pacientes com neutropenia prolongada, em especial naqueles submetidos a transplante de medula óssea (TMO), com considerável mortalidade.<sup>1</sup>

O *Aspergillus* é onipresente no ambiente, e a porta de entrada no homem é, comumente, o pulmão.<sup>2</sup> O microrganismo freqüentemente invade os vasos sanguíneos, levando à disseminação hematogênica. A hemocultura de pacientes com infecção disseminada é raramente positiva.<sup>3</sup>

Embora a letalidade entre os pacientes com doença pulmonar localizada seja significativa (42%), a sobrevida é ainda menor se o tratamento só é iniciado quando a doença

já se disseminou. Sabe-se, hoje, que na aspergilose invasiva não tratada a mortalidade é de 100% dos pacientes.<sup>4</sup>

Em pacientes transplantados, infecções fatais foram identificadas em 63% dos transplantes alogênicos e em 25% dos transplantes autólogos. As infecções fúngicas foram as responsáveis pelo óbito em 35,7% desses pacientes, sendo que, em 52%, o diagnóstico da infecção fúngica só foi possível com a realização da autópsia.<sup>5</sup>

Tanto em métodos sorológicos como em cultura de secreção pulmonar para detecção de infecção por *Aspergillus*, a sensibilidade e a especificidade são freqüentemente inadequadas. A detecção do antígeno galactomanana, um exoantígeno do *Aspergillus*, tem sido mostrada, recentemente, como um teste útil para o diagnóstico precoce da aspergilose invasiva (sensibilidade=94%; especificidade=98%). Métodos baseados em PCR têm sido propostos para o diagnóstico precoce da infecção invasiva por *Aspergillus*.<sup>6</sup>

Nosso estudo teve como objetivo padronizar a reação de PCR-Nested para detecção de *Aspergillus sp* em 23 pacientes neutropênicos, febris, com doenças onco-hematológicas em programa de TMO internados no Hospital das Clínicas da FMUSP.

O DNA das amostras foi extraído a partir de 5 mL de sangue pela técnica de fenol-clorofórmio modificada.<sup>6</sup> Após centrifugação da amostra, o pellet foi ressuspensão em 300 µL de PBS (pH=7,4), transferido para tubo Eppendorf, ao qual foram adicionados 125U de Líticase (Sigma, EUA) e incubados 24 horas a 37°C. Foram acrescentados 1600 µg de Proteinase K e 0,5% SDS, incubados 16 horas a 37°C. Foram adicionados 100 µL de 2 x buffer de extração (40 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% SDS), incubados 24 horas a 37°C. À solução final, adicionaram-se 500 µL de fenol, agitados intensamente por 5 min e centrifugados por 10 min a 3000 r.p.m. Ao sobrenadante foram acrescentados 250 µL de fenol e de clorofórmio; centrifugado por 10 min a 3000 r.p.m. O sobrenadante foi transferido para outro tubo ao qual foram acrescentados 500 µL de clorofórmio, agitados intensamente e centrifugados por 10 min a 3000 r.p.m. Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol (70% do volume obtido). A solução foi centrifugada por 5 min a 10.000 r.p.m., e o pellet foi lavado com 1 mL de etanol a 70%, centrifugado por 10 min a 5000 r.p.m e desprezado o sobrenadante. Após secagem, o pellet foi ressuspensão em 20 µL de água estéril. Como controle positivo, utilizamos cultura fúngica subcultivada inoculada em 5ml de sangue submetido ao mesmo processo de extração de DNA. Como controle negativo, foi utilizada amostra de indivíduo saudável e, para avaliação de reação cruzada, foi utilizada cultura fúngica subcultivada de *Candida albicans*.

Para o PCR-Nested, na primeira fase da reação de PCR foi utilizado tampão de reação 1 x pH=8,0 (20 mM Tris-HCl; 40 mM NaCl, 2 mM Fosfato de Sódio, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT) e 50% (v/v) glicerol, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de DNTPs (Pharmacia), 10 pMol dos primers AFU7S (5'CGGCCCTTA AATAGCCCG) e AFU7AS (5' GACCGGGTTTGACCA ACTTT), 1 U TaqDNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Brasil) e 10 µL de DNA. Na segunda fase, foi usado tampão,

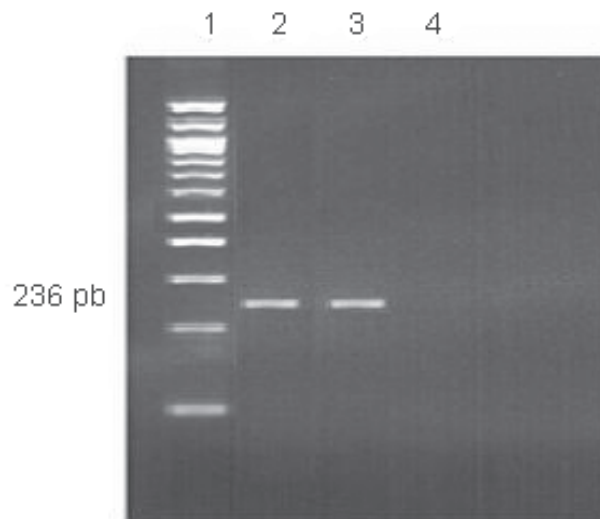


Figura 1. Resultado da amplificação por PCR-Nested de *Aspergillus*. linha 1: marcador de peso molecular/Ladder; linha 2: paciente positivo; linha 3: controle positivo; linha 4: controle negativo

MgCl<sub>2</sub> e DNTPs na mesma proporção da primeira fase da reação, 10pMol dos primers AFU5S (5'AGGGGCCAGCGA-GTACATCACCTTG) e AFU5AS (GGGRGTCGTTGCCAAC YCYCC-TGA), 1U TaqDNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Brasil) e 2 µL do produto de PCR da primeira fase. As condições da primeira fase de amplificação foram 94°C por 2 min, seguido de 26 ciclos de 94°C por 40 segs, 54°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min. As condições da segunda fase de amplificação foram 96°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 96°C por 20 seg, 65°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, e uma extensão final de 72°C por 5 min (Termociclador Biometra, Alemanha). Os produtos de PCR (236pb) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado por luz ultravioleta (Fotodocumentador Wealtec, USA). (Figura 1).

Dos pacientes avaliados, seis (21,7%) apresentaram resultados de PCR positivo para *Aspergillus*, cinco desses confirmados posteriormente pela tomografia de tórax de alta resolução, evidenciando comprometimento pulmonar. Em uma única amostra que apresentou resultado de PCR-positivo, não pôde ser observada evidência clínica de infecção por *Aspergillus* durante o período estudado. Na nossa casuística, a sensibilidade, especificidade, os valores preditivos positivo(+) e negativo(-) desse método para detecção de *Aspergillus* foram, de 100%, 94,4%, 83,3%, e 100%.

Nossos dados demonstram que o teste de PCR-Nested tem considerável potencial clínico para o diagnóstico precoce de Aspergilose invasiva.

### Abstract

*Invasive aspergillosis is an important cause of mortality in long-term neutropenic patients, particularly after bone marrow (B.M.T.) and solid organ transplantation. More than 90% of invasive fungal infections in immunocompromised patients can be attributed to Candida and Aspergillus. To date, there is no fast, reliable and feasible test for Aspergillus infection detection in routine procedures. In the present report, a nested PCR technique, developed to detect Aspergillus infection, is described. In our study, the sensitivity, specificity, positive and negative values using this approach were 100%, 94.4%, 83.3%, and 100%, respectively. Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(2):162-163.*

**Key words:** Transplant; fungal infection; aspergillosis; bone marrow transplant; PCR.

### Referências Bibliográficas

1. Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. QJM. 2007;100(6):317-34.
2. Bhatti Z, Shaikat A, Almyroudis NG, Segal BH. Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Mycopathologia. 2006;162(1):1-15.
3. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. Drugs. 2007;67(11):1567-601.
4. Chandrasekar PH, Weinmann A, Shearer C. Autopsy-identified infections among bone marrow transplant recipients: a clinicopathologic study of 56 patients. Bone Marrow Transplantation Team. Bone Marrow Transplant. 1995;16(5):675-81.
5. O'Brien SN, Blijlevens NM, Mahfouz TH, Anaissie EJ. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003;438-72.
6. Halliday C, Hoile R, Sorrel T, James G, Yadav S, Shaw P *et al*. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. Br J Haematol. 2005;132(4):478-86.

Avaliação: Editor e dois revisores externos  
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 07/02/2008  
Aceito: 20/02/2008

**Correspondência:** Marcia Cristina Zago Novaretti  
Divisão de Imunohematologia da Fundação Pró-Sangue/  
Hemocentro de São Paulo  
Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155 – 1º andar  
05403-000 – São Paulo-SP – Brasil  
E-mail:marcia@iqs.med.br