



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde
Gabriel Monteiro da Silva. 700. Centro. Alfenas. MG. 37130-000.



LETÍCIA MARIA LEOMIL COELHO

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE**

Alfenas/MG

2013

LETÍCIA MARIA LEOMIL COELHO

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Alfenas/MG

2013

Coelho, Leticia Maria Leomil.
Padronização de ensaio imunoenzimático para diagnóstico da
esporotricose / Leticia Maria Leomil Coelho. - 2013.
50 f. -

Orientador: Luiz Cosme Cotta Malaquias.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.
Bibliografia.

1. Esporotricose. 2. Diagnóstico. 3. Ensaio de Imunoadsorção
Enzimática. 4. Ureia. I. Malaquias, Luiz Cosme Cotta. II. Título.

CDD: 616.079

LETÍCIA MARIA LEOMIL COELHO

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: doenças infecciosas e parasitárias.

Aprovada em: 28 de junho de 2013.


Profa. Dra. Raquel Lopes Martins de Souza

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:


Profa. Dra. Eva Burger



Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:


Prof. Dr. Luiz Cosme Cottá Malaquias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade fornecida aos alunos do curso de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde.

Aos professores do Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde, pelos conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

Ao Professor Luiz Cosme Cotta Malaquias, pela orientação dedicada a mim neste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pelo acolhimento no laboratório.

Ao Professor Jorge Kleber Chavasco, pela co-orientação dedicada a mim neste trabalho.

Ao Professor Zoilo Pires Camargo, pelo preparo do antígeno utilizado neste trabalho.

Ao Professor Mario León Silva Vergara, pelos soros de pacientes com esporotricose cedidos para utilização neste trabalho.

Aos Professores Eric Batista Ferreira e Denismar Alves Nogueira, pela colaboração na estatística do trabalho.

A Universidade José do Rosário Vellano, pelos coelhos cedidos para produção de soros hiperimunes.

A Professora Maria Lúcia e Miriam Boczar, pelo suporte dado nos experimentos envolvendo a imunização dos coelhos.

A CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

Aos meus pais, irmãos, cunhadas e afilhada, por todo amor e apoio dedicados a mim.

Ao meu namorado, por todo carinho e incentivo dedicados a mim.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A esporotricose é uma micose causada pela inoculação traumática na pele com material contaminado com o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. As formas clínicas mais comuns são a linfocutânea e a cutânea fixa. A prevalência é maior em área tropical e em zona temperada. No entanto, a prevalência real da esporotricose em áreas urbanas e rurais é desconhecida, pois não há notificação compulsória. O aumento do número de casos, nos últimos anos, está relacionado à transmissão feita por animais de estimação. Os métodos de diagnóstico diretos disponíveis demoram dias para serem concluídos. Por sua vez, métodos sorológicos podem gerar resultados falsos positivos ou negativos devido a reações cruzadas entre antígenos do *S. schenckii* com de outros fungos. Por esse motivo, é necessário o desenvolvimento de testes sorológicos, com alta sensibilidade e especificidade, que garantam um diagnóstico confiável. Este estudo teve por objetivo padronizar um ensaio imunoenzimático (ELISA), com maior sensibilidade e especificidade, para diagnóstico sorológico da esporotricose. Nesse trabalho, placas de poliestireno foram sensibilizadas com exoantígenos de cultura da forma leveduriforme de *S. schenckii* e testadas utilizando soros de pacientes com esporotricose, soros de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM), assim como de indivíduos esporotriquina negativos. Duas estratégias foram utilizadas, uma tratando o antígeno com metaperiodato de sódio e outra tratando os soros com uréia 6M em diferentes tempos de incubação. Os resultados mostraram que a estratégia utilizando metaperiodato de sódio não melhorou o poder do ensaio em discriminar os soros dos pacientes com esporotricose daqueles sem esporotricose ou com PCM. No entanto, a estratégia utilizando uréia 6M melhorou significativamente o poder de discriminação do método. As melhores condições do teste foram tratamento com uréia por 5, 10 e 20 minutos e diluição dos soros a 1\800 e 1\1600.

Palavras-chave: Esporotricose. Diagnóstico. ELISA. Uréia. *Sporothrix schenckii*.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a fungal infection caused by traumatic inoculation in the skin with contaminated material with the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. The most common clinical forms are fixed cutaneous and lymphocutaneous. Its prevalence is higher in the tropical and temperate zone. However, the actual prevalence of sporotrichosis in urban and rural areas is unknown because there is no mandatory reporting. The number of cases is increasing in the last years mainly due to transmission made by pets. The results of direct diagnostic methods take days to be released. In turn, serological methods may lead to false positive or negative results due to cross-reactions between antigens from *S. schenckii* with others fungi. Therefore, it is necessary to develop serological tests with high sensitivity and specificity to ensure a reliable diagnosis. This study aimed to standardize an enzyme immunoassay (ELISA) with higher sensitivity and specificity for serological diagnosis of sporotrichosis. In this work, polystyrene plates were sensitized with exoantigens obtained from yeast form of *S. schenckii* and tested using sera from patients with sporotrichosis, sera from patients with paracoccidioidomycosis (PCM), as well as individuals with sporotrichin negative tests. Two strategies were used, one treating the antigen with sodium metaperiodate and another treating the serum with 6M urea at different incubation times. The results showed that the strategy using sodium metaperiodate not improved the discriminating power of the test sera from patients with sporotrichosis from those without sporotrichosis or with PCM. However, the strategy using 6M urea significantly improved discrimination power of the method. The best conditions of the test were the dilution of the sera to 1\800 and 1\1600 and treatment with urea for 5, 10 and 20 minutes.

Key words: Sporotrichosis. Diagnoses. ELISA. Urea. *Sporothrix schenckii*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA	–	ensaio imunoenzimático
PAGE	–	eletroforese em gel de poliacrilamida
PCM	–	paracoccidioidomicose
ROC	–	receiver operating characteristic
SDS	–	dodecil sulfato de sódio
Esp+	–	esporotricose positivo
Esp-	–	esporotriquina negativo
g/L	–	grama por litro
µg/mL	–	micrograma por mililitro
kDa	–	quilo Daltons
M	–	molar
mM	–	micromolar
mL	–	mililitro
µL	–	microlitro
N	–	normal
nm	–	nanômetro
rpm	–	rotações por minuto
v/v	–	volume por volume
%	–	porcentagem
°C	–	graus Celsius
p/v	–	peso por volume
g	–	gramas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica, por país, de publicações científicas sobre esporotricose no século XXI de acordo com tipo de artigo.....	13
Figura 2 - Esporotricose linfocutânea	14
Figura 3 - Esporotricose cutânea fixa	15
Figura 4 - Esporotricose cutânea disseminada	15
Figura 5 - Características macroscópicas das colônias de <i>S. schenckii</i>	17
Figura 6 - Forma filamentosa do <i>S. schenckii</i>	18
Figura 7 - Forma leveduriforme do <i>S. schenckii</i>	18
Figura 8 - Perfil proteico do exoantígeno de <i>S. schenckii</i> em gel de poliacrilamida a 12%.	28
Figura 9 - Imunodifusão radial utilizando soros de coelhos imunizados com antígeno de <i>S. schenckii</i>	29
Figura 10 - Médias e desvio padrão das D.O. da ELISA a 490 nm utilizando soros de pacientes com esporotricose (Esp+, n=8), soros de pacientes esporotriquina negativos (Esp-, n=8) e de soros de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM, n=8).	31
Figura 11 - Médias e desvio padrão das D.O. da ELISA a 490 nm utilizando soros de pacientes com esporotricose (Esp+, n=8), soros de pacientes esporotriquina negativos (Esp-, n=8) e soros de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM, n=8) na ausência (A) ou presença de metaperiodato (B).	32

- Figura 12 - Médias das D.O. da ELISA a 490 nm dos soros sem tratamento com uréia (A), com o tratamento de 1 minuto com uréia (B), com tratamento de 5 minutos com uréia (C), com tratamento de 10 minutos com uréia (D), com tratamento de 20 minutos com uréia (E). Esp+: soros de pacientes com esporotricose (n=8). Esp-: soros de pacientes esporotriquina negativos (n=8). PCM: soros de pacientes com paracoccidioidomicose (n= 8)..... 34
- Figura 13 - Curvas de ROC comparando diferentes diluições dos soros e a adição ou não de metaperiodato de sódio. 36
- Figura 14 - Curvas de ROC comparando diferentes diluições de soros e a adição ou não de uréia. 37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	HISTÓRICO E PREVALÊNCIA	12
1.2	ESPOROTRICOSE	15
1.3	AGENTE ETIOLÓGICO.....	17
1.4	DIAGNÓSTICO.....	19
1.4.1	Testes sorológicos	20
1.4.2	Ensaio imunoenzimático – ELISA	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	PRODUÇÃO DO EXOANTÍGENO DO <i>Sporothrix schenckii</i>	23
3.2	ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12%	23
3.3	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOROS	24
3.4	PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI- <i>Sporothrix schenckii</i> EM COELHO	24
3.5	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	25
3.5.1	Modificações no ensaio imunoenzimático –ELISA	26
3.6	MUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA	26
3.7	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS	29
4.1	ELETROFORESE DO EXOANTÍGENO DO <i>Sporothrix schenckii</i>	29
4.2	PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI- <i>Sporothrix schenckii</i> EM COELHO	30
4.3	DOSAGEM DE ANTICORPOS NOS SOROS UTILIZANDO A TÉCNICA IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA.....	30
4.4	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	31
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	43

REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	49

1 INTRODUÇÃO

Sporothrix schenckii é o agente etiológico da esporotricose, infecção fúngica causada pela inoculação traumática com material contaminado com seus esporos. Este fungo apresenta dimorfismo térmico, cresce sob a forma filamentosa a 25 °C e apresenta crescimento leveduriforme a 37 °C.

A infecção pode se apresentar em diferentes formas clínicas, sendo divididas em: linfocutânea, cutânea localizada, cutânea disseminada e extracutânea. O diagnóstico definitivo é feito pela identificação do fungo em cultura, na qual amostras obtidas do paciente são semeadas em ágar Sabouraud e cultivadas a 25 °C. Este método é demorado e muitas vezes pode-se não conseguir isolar o fungo, levando a um resultado falso negativo. Uma alternativa são os métodos sorológicos, que disponibilizam o resultado de forma mais rápida e em geral apresentam valores satisfatórios de sensibilidade e especificidade.

O presente estudo descreve a padronização de um ensaio imunoenzimático indireto utilizando exoantígeno da forma leveduriforme de *S. schenckii* para diagnóstico da esporotricose visando à detecção e quantificação de anticorpos. Com o objetivo de aumentar os valores de sensibilidade e especificidade do método, no diagnóstico desta infecção, duas estratégias foram utilizadas, uma tratando o antígeno com uma solução de metaperiodato de sódio e a outra tratando o soro com uma solução de uréia 6M.

1.1 HISTÓRICO E PREVALÊNCIA

A esporotricose foi descrita pela primeira vez por Benjamin Schenck em 1898, quando o mesmo era estudante de medicina em Baltimore. Após isolar o agente etiológico de uma lesão na mão e no braço direito de um homem, Schenck enviou o isolado, obtido da secreção dos abscessos das lesões, para um micologista que concluiu que o microrganismo era do gênero *Sporotrichum* (SCHENCK, 1898 apud RAMOS-e-SILVA et al., 2007). Em 1900, dois pesquisadores, Hektoen & Perkins, relataram o desenvolvimento de uma lesão no dedo de um menino após ter

sido ferido por um martelo, lesão que regrediu espontaneamente. Tais pesquisadores classificaram o fungo como *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN; PERKINS, 1900). No Brasil, em 1907, foi descrito o primeiro caso de infecção natural em animais, no caso em ratos (LUTZ; SPLENDORE, 1907).

Este fungo tem sido relatado em diversas áreas do mundo e, nos anos mais recentes, a maioria dos casos publicados são provenientes da América Central e do Sul, principalmente México, Brasil, Colômbia e Peru (SCHECHTMAN, 2010a), e, de acordo com Barros, Almeida-Paes e Schubach (2011), a doença é mais relatada em área tropical e em zonas temperadas. Lopes e colaboradores (1999) afirmam que na América do Sul a doença ocorre mais frequentemente no verão e no outono, entretanto, outros autores não relatam essa diferença entre as estações (BARROS et al., 2004).

Os países responsáveis pela maior produção científica sobre a esporotricose no século XXI foram: Brasil, Estados Unidos, Índia e Japão (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011) (Figura 1).

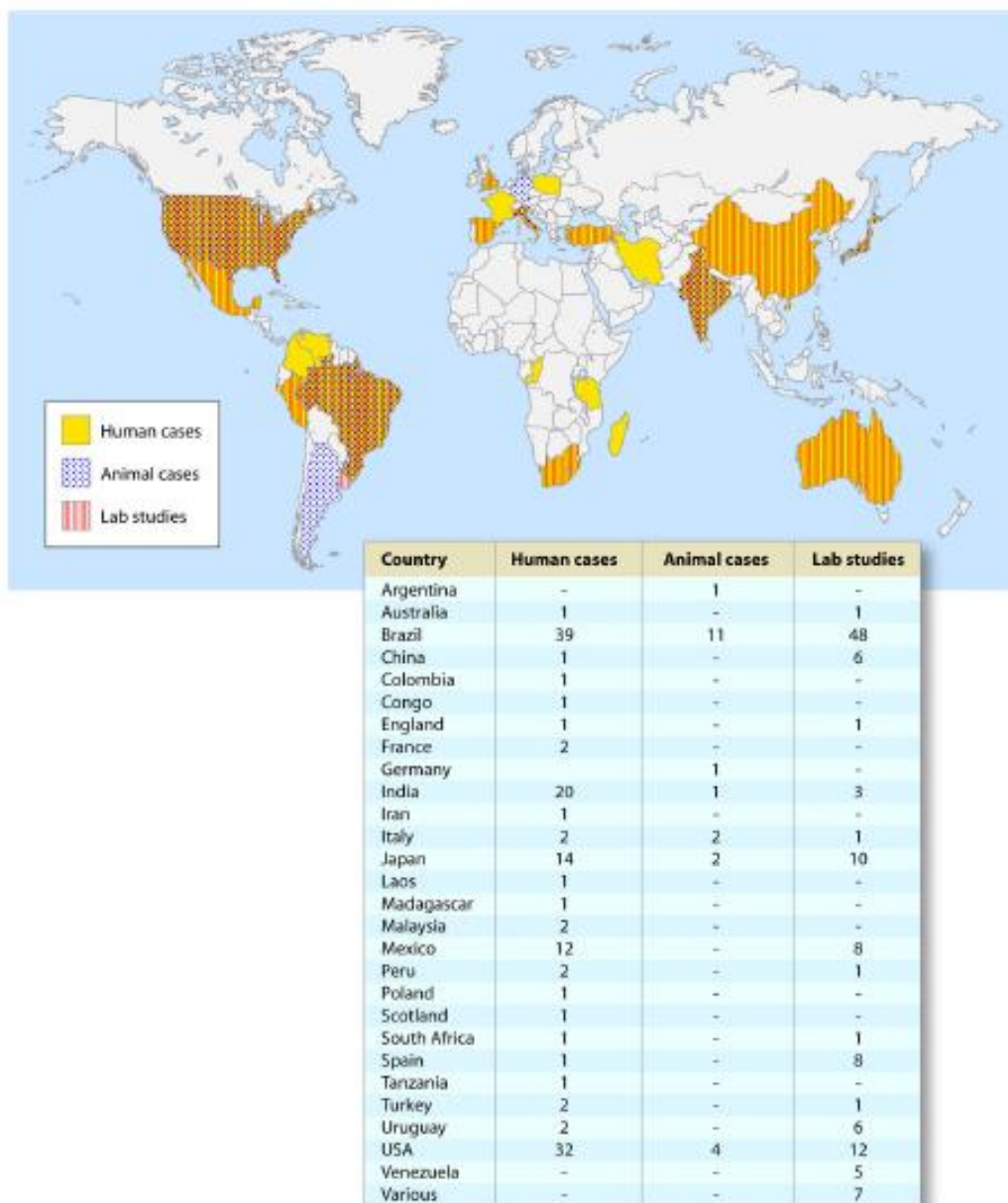


Figura 1 - Distribuição geográfica, por país, de publicações científicas sobre esporotricose no século XXI de acordo com o tipo de artigo.
 Fonte: BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH (2011).

O número de casos envolvendo mulheres e homens variam de região para região e a incidência maior é entre pessoas que trabalham com exposição direta a terra, como agricultores (BARROS et al., 2004, BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

A partir da década de oitenta, os gatos domésticos também ganharam importância na transmissão da esporotricose aos seres humanos, sendo relatada uma epidemia no Rio de Janeiro, mas neste caso os principais doentes eram mulheres que tomavam conta dos animais de estimação (BARROS et al., 2001).

1.2 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é causada pela inoculação traumática com material contaminado com *S. schenckii* na pele ou no tecido subcutâneo. Geralmente o trauma ocorre por espinhos, farpas, arranhadura, mordedura ou ainda através da contaminação de solução de continuidade cutânea pré-existente. Em alguns casos verifica-se infecção por inalação de conídios (MARQUES et al., 1993; RAMOS-e-SILVA et al., 2007).

As formas clínicas da esporotricose são muito variadas, sendo divididas em quatro categorias: linfocutânea, cutânea localizada, cutânea disseminada e extracutânea (MORRIS-JONES, 2002; RAMOS-e-SILVA et al., 2007; VÁSQUEZ-del-MERCADO; ARENAS; PADILLA-DESGARENES, 2012). A severidade da forma clínica da esporotricose depende do local e da profundidade da infecção, virulência da cepa do fungo e também estado imunológico do paciente (KONG et al., 2006).

A forma linfocutânea (Figura 2) representa a maior parte dos casos e é caracterizada inicialmente pela presença de um nódulo subcutâneo duro e móvel, que se dissemina pelos canais linfáticos locais, gerando outros nódulos, que podem ulcerar e drenar pus.

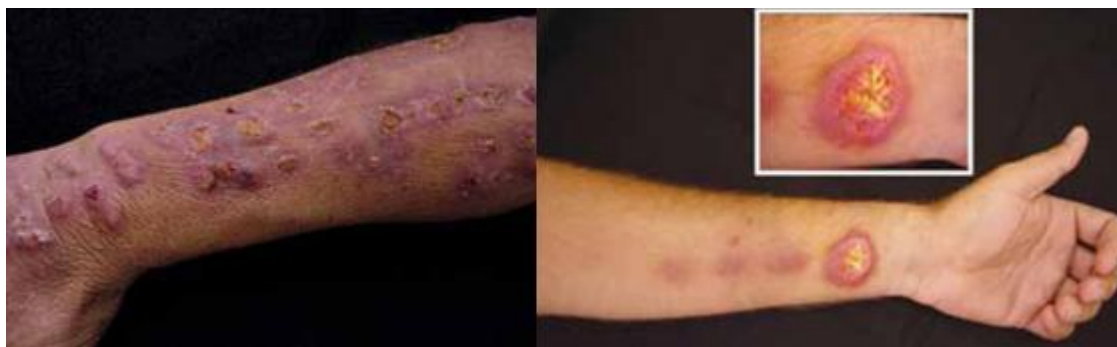


Figura 2 - Esporotricose linfocutânea.
Fonte: SCHECHTMAN (2010a).

Já a forma cutânea localizada (Figura 3) permanece uma lesão única e não entra em contato com os canais linfáticos. A forma cutânea disseminada (Figura 4) apresenta várias lesões por todo o corpo, podendo atingir ossos e articulações, entretanto, sua incidência é baixa (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; SCHECHTMAN, 2010a).



Figura 3 - Esporotricose cutânea fixa.
Fonte: SCHECHTMAN (2010a).



Figura 4 - Esporotricose cutânea disseminada.
Fonte: <http://www.micologia.com.br/esporeticose.shtml>.

Provavelmente o fungo dissemina-se pelo organismo pela via hematogênica, pois o *S. schenckii* é capaz de interagir com células endoteliais *in vitro* e atravessá-las (MORRIS-JONES, 2002; FIGUEIREDO et al., 2004). A forma extracutânea é muito rara e o local mais atingido é o pulmão, por inalação de conídios, mas este quadro também pode ser desenvolvido a partir de uma lesão cutânea (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Embora existam relatos de casos com regressão espontânea da esporotricose (BARROS et al., 2003), o tratamento é necessário para a maioria dos

pacientes (DAVIS, 1996). Durante muitas décadas o medicamento mais utilizado foi o iodeto de potássio que agia diretamente sobre o fungo, mas não estimulava a imunidade contra o patógeno. Entretanto, este medicamento está associado a altos índices de alergias, além de outros efeitos colaterais graves, como edema pulmonar, angiodema, mialgia, linfadenopatia entre outros. Seu uso também é desaconselhado em mulheres grávidas e em pessoas com comprometimento da tireóide e dos rins (STERLING; HEYMANN, 2000). Diante desse problema, nos países desenvolvidos (MORRIS-JONES, 2002) e mais recentemente no Brasil, o tratamento de pacientes com esporotricose é realizado com itraconazol, apresentando uma boa evolução para cura (BARROS et al., 2004). Entretanto, pacientes com a forma disseminada da infecção podem apresentar falhas, devido a uma menor susceptibilidade ao itraconazol (TRILLES et al., 2005). Uma alternativa para tratamento desses pacientes mais graves é a anfotericina B (KOHLENER; HAMDAN; FERRARI, 2007). Todos esses fatores levam a uma busca por novas estratégias terapêuticas para a esporotricose.

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da esporotricose é o fungo ambiental dimórfico *S. schenckii*. Esse microrganismo faz parte do Reino *Fungi*, é um organismo eucariótico, heterotrófico, sem mobilidade própria e apresenta parede celular rígida e quitinosa (GARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

O *S. schenckii* cresce na forma filamentosa em temperaturas entre 25-30 °C e a 37 °C, *in vitro* ou nos tecidos, na forma leveduriforme. Este fungo cresce adequadamente em meios Ágar de rotina (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

Até o momento não se conhece a forma de reprodução sexuada de *S. schenckii*, embora haja fortes evidências moleculares de que este fungo sofra mecanismos de recombinação na natureza (MESA-ARANGO et al., 2002).

1.3.1 Características macroscópicas

A forma micelar cresce rapidamente com a superfície das colônias, membranosa, achatada e pregueada. Inicialmente apresenta-se esbranquiçada e com o passar do tempo tendem ao marrom, cinza escuro ou preto. As colônias na forma leveduriforme são úmidas, cremosas e esbranquiçadas (VIDOTTO, 2004; SCHECHTMAN, 2010b, BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011) (Figura 5).



Figura 5 - Características macroscópicas das colônias de *S. schenckii*. O tubo da esquerda e o central contém ágar Sabouraud e foram cultivados à 25 °C, mostram a forma filamentosa. O tubo da direita contém Ágar infusão cérebro coração e foi cultivado a 37 °C, mostra a forma leveduriforme.

Fonte: BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH (2011).

A adição de tiamina e biotina as culturas e também o baixo teor de gás carbônico facilitam a conversão da forma filamentosa em leveduriforme (LACAZ et al., 2002; SCHECHTMAN, 2010b).

1.3.2 Características microscópicas

Na forma filamentosa é possível observar um micélio hialino, com hifas sutis, ramificadas e septadas. Os conidióforos surgem das hifas, eretos ou dobrados e podem expandir-se formando pequenas vesículas denticuladas. Estes dentículos originam os conídios dispostos em forma de flor, que podem ser hialinos com parede sutil ou escuros com parede espessa (VIDOTTO, 2004; SCHECHTMAN, 2010b) (Figura 6).

A forma leveduriforme pode ser simples ou gemulante, variando na forma e dimensões (Figura 7).

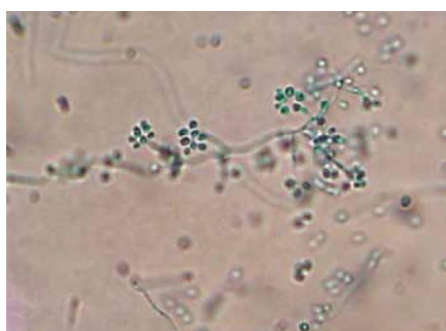


Figura 6 - Forma filamentosa do *S. schenckii*.
Fonte: SCHECHTMAN (2010b).



Figura 7 - Forma leveduriforme do *S. schenckii*.
Fonte: <http://www.vet.uga.edu/vpp/archives/vm/PORT/EZD/scen06/agent06.htm>.

1.4 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico da esporotricose pode-se realizar a cultura, cortes histológicos ou esfregaços, utilizando material para biópsia ou exsudato da lesão ulcerativa. Outras técnicas utilizadas são a intradermoreação, como auxílio ao diagnóstico, e exames sorológicos.

No exame microscópico utiliza-se corante de rotina para paredes celulares fúngicas, como o ácido periódico de Schiff, para facilitar a visualização do fungo, porém a observação das formas leveduriformes características do *S. schenckii* não é fácil (MORRIS-JONES, 2002).

Na cultura, as amostras são semeadas em ágar Sabouraud contendo antibióticos e incubadas a 25-30 °C. A confirmação é feita pelo crescimento do fungo a 35-37 °C e sua conversão na forma de levedura (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011).

A intradermorreação, teste cutâneo, é mais utilizada com caráter epidemiológico, e aplica-se no paciente a esporotriquina, para avaliação da reação de hipersensibilidade tardia, ou seja, resposta imune celular. Ela é usualmente positiva em mais de 90 % dos casos comprovados de esporotricose, mas pode indicar infecção anterior (ITOH; OKAMOTO; KARIYA, 1986).

1.4.1 Testes sorológicos

Para diagnóstico da esporotricose pode-se realizar os seguintes testes sorológicos: fixação do complemento, aglutinação em tubo, aglutinação em látex e imunodifusão.

Atualmente, a técnica de fixação do complemento não é utilizada na rotina.

Na técnica de aglutinação, uma amostra que contém o anticorpo específico (ou o antígeno) é misturada ao látex previamente sensibilizado com o antígeno específico (ou com o anticorpo) e de aparência leitosa, assim ocorrerá uma aglutinação visível (formação do complexo antígeno-anticorpo). O grau de aglutinação será em função da concentração do aglutinante e do aglutinado (BANGS, 1996).

A imunodifusão dupla é feita em uma placa ou lâmina com ágar furado em vários poços, sendo que nos poços periféricos coloca-se o soro de pacientes em diluição seriada e o controle e, no poço central o antígeno na melhor diluição encontrada. O resultado positivo é observado pela formação de uma linha de precipitação (BLUMER et al., 1973). Apesar de ser uma técnica utilizada no diagnóstico de algumas doenças sua execução é demorada e o resultado leva uma semana para ser liberado.

1.4.2 Ensaio imunoenzimático – ELISA

Técnicas imunológicas mais sensíveis começaram a ser padronizadas para sua utilização no sorodiagnóstico da esporotricose. Cinco técnicas de ELISA que pesquisaram imunoglobulinas do isotipo G foram descritas. Uma utilizando extrato bruto de cultivo da forma leveduriforme (SCOTT; MUCHMORE, 1989), duas utilizando um antígeno purificado da parede celular da forma leveduriforme (BERNARDES-ENGEMANN et. al, 2005 *apud* LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; BERNARDES-ENGEMANN et al., 2009 *apud* FERNANDES et al., 2011), outra utilizando extrato bruto do cultivo da forma filamentosa de *S. schenckii* (ALMEIDA-PAES et. al, 2007a) e outra comparando a utilização do antígeno purificado da parede celular com a utilização do extrato bruto (FERNANDES et al., 2011). A pesquisa de Bernardes-Engemann e colaboradores (2005) e de Almeida-Paes e colaboradores (2007a) apresentaram valores satisfatórios de sensibilidade, variando de 97% a 90%, e especificidade, variando de e 86% a 89%, respectivamente. Outra técnica de ELISA descrita para esporotricose pesquisou a presença de imunoglobulinas G, M e A, e os achados demonstraram que as imunoglobulinas M e A também participam da patogenia da esporotricose, sendo que as imunoglobulinas M são produzidas no início da infecção e as imunoglobulinas A são produzidas quando a infecção ocorre em mucosas (ALMEIDA-PAES et al., 2007b). Estes resultados mostram que ensaios imunoenzimáticos podem contribuir para o diagnóstico da esporotricose, porém um desafio é obter um teste de alta sensibilidade e ao mesmo tempo alta especificidade, devido às diversas infecções fúngicas, responsáveis pelas reações cruzadas.

Ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico de outras doenças causadas por fungos dimórficos estão disponíveis, entretanto a utilização da técnica sem modificações não permite obter valores satisfatórios de especificidade (GUIMARÃES et al., 2004; ALBUQUERQUE; MARQUES da SILVA; CAMARGO, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e avaliar ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico mais sensível e específico da esporotricose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade e especificidade do ensaio imunodifusão radial dupla utilizando um painel de soros de pacientes com esporotricose, soros de pacientes com paracoccidioidomicose e soros de indivíduos com teste da esporotriquina negativo, como controle negativo, utilizando exoantígenos do *Sporothrix schenckii*;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade do ensaio imunoenzimático utilizando o mesmo painel de soros e mesmo exoantígeno;
- Avaliar o efeito do metaperiodato de sódio e da uréia 6M sobre a sensibilidade e especificidade do ensaio imunoenzimático utilizando o mesmo painel de soros e mesmo exoantígeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DO EXOANTÍGENO DO *Sporothrix schenckii*

Os exoantígenos secretados pelo *S. schenckii* foram preparados e gentilmente cedidos pelo professor Dr. Zoilo Pires Camargo da UNIFESP de forma semelhante a descrita por Silveira-Gomes e colaboradores (2011) para *Paracoccidioides brasiliensis*. Resumidamente: o isolado Ss118 de *S. schenckii* foi cultivado em tubo inclinado contendo ágar Sabouraud por 3 dias a 35 °C. Após esse período, coletou-se células de levedura de pelo menos 10 tubos, produzindo um inóculo de 2×10^6 células. Essas células foram inoculadas em 100 mL de caldo de extrato de levedura-peptona-dextrose. Incubou-se a cultura por 3 dias a 35 °C em um shaker a 50 rpm. O crescimento foi transferido para 500 mL de caldo de extrato de levedura-peptona-dextrose. Os frascos foram incubados por mais 7 dias como descrito anteriormente. A cultura foi morta com timerosal (0,2 g/L). O sobrenadante de cultura foi obtido por filtração em papel e concentrado por vácuo a 45 °C. A solução foi dialisada contra água destilada. Após a diálise, concentrou-se a solução outra vez. O teor de proteína foi medido pelo método de Bradford (1976).

3.2 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12%

Alíquotas com diferentes volumes, correspondendo a diferentes concentrações proteicas do antígeno, foram submetidas à separação segundo o seu peso molecular. A técnica de separação utilizada foi a SDS-PAGE, descrita por Weber e Osborn (1969) com algumas modificações.

Para obter o perfil das bandas protéicas foram utilizados dois tipos de géis: de separação e de empilhamento.

As amostras foram desnaturadas em um tampão (tris-HCl 1,5 M, pH 6.8, SDS 20%, glicerol, azul de bromofenol 1% e β -mercaptoetanol) e aquecidas por 10 minutos a 100 °C. Após a desnaturação, as amostras foram aplicadas nos géis.

Para separar as proteínas das amostras, os géis foram submetidos a uma voltagem de 50 volts até chegar no gel de separação e depois aumentou-se a voltagem para 100 volts. Finalmente, os géis foram revelados usando a coloração pela prata (kit Silver Stain Plus – BioRad).

3.3 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOROS

Quatro amostras de soros de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial (cultura) da esporotricose utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Professor Mario Léon Silva Vergara da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Foram também utilizadas 11 amostras de soros de indivíduos esporotriquina negativos (controle negativo) e 8 soros de pacientes com diagnóstico sorológico por imunodifusão dupla de PCM, escolhida por ser uma micose endêmica na região de Alfenas e que pode apresentar reação cruzada com a esporotricose, perfazendo um total de 23 amostras.

3.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-*Sporothrix schenckii* EM COELHO

Para a produção do soro hiperimune anti-*S. schenckii* foram utilizados dois coelhos machos cedidos pelo biotério da UNIFENAS. Os coelhos foram inoculados cada um com 600 μ L de imunógeno de exoantígeno (340 μ g/mL) de *S. schenckii* em adjuvante incompleto de Freund (v/v) (Sigma). Os dois coelhos foram imunizados quatro vezes por via subcutânea com intervalos de uma semana. Após se conseguir uma resposta adequada através de ensaio de imunodifusão, os animais foram anestesiados e o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca. Os soros

foram separados em alíquotas e armazenados a -20 °C. Os soros dos coelhos hiperimunizados foram usados como controle positivo no ensaio de imunodifusão radial dupla. O soro dos animais coletados antes da imunização foram utilizados como controle negativo.

3.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

O ensaio de ELISA indireto foi realizado como descrito por Camargo e colaboradores (1984) com algumas modificações.

Placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano (NUNC) foram sensibilizadas com 100 µL por poço com antígeno do *S. schenckii* a 5 µg/mL, em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9.6). Em seguida, a placa foi incubada a 4 °C por 16 horas. Findo este período, a placa foi lavada três vezes com salina e Tween 20 (NaCl 0,9 %-Tween 0,05 %), retirando o excesso de solução. Posteriormente, a placa foi bloqueada com 200 µL por poço com solução de leite desnatado (Molico®) a 5 % em salina tamponada fosfatada e Tween 20 (PBS-Tween 0,05 %), por uma hora em estufa a 37 °C. A placa foi lavada novamente três vezes com NaCl 0,9 %-Tween 0,05 %. A seguir, 100 µL das diluições 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 e 1/3200 dos soros de pacientes com cultura e sorologia de esporotricose, pacientes com sorologia positiva para PCM e de pacientes esporotriquina negativos em solução 3 % de gelatina em PBS-Tween 0,05 % foram adicionadas na placa. Seguiu-se então a incubação da placa durante uma hora a 37 °C. Após este período, a placa foi novamente lavada cuidadosamente três vezes com NaCl 0,9 %-Tween 0,05 %. Em seguida, foram adicionados 100 µL de conjugado de cabra anti-IgG humana total marcada com peroxidase (SIGMA) na diluição de 1:8000 em solução 3 % de gelatina em PBS-Tween 0,05 % por uma hora a 37 °C. A placa foi lavada três vezes com NaCl 0,9 %-Tween 0,05 %. A seguir, em cada poço da placa, foi adicionado 100 µL do substrato enzimático orto-fenilenodiamina (*Ortho-Phenylenediamine* - OPD - Sigma) preparado em tampão citrato (0,1 M pH 4,5) e deixado desenvolver cor por cerca de oito a dez minutos em câmara escura. A reação foi então paralisada pela adição de 30 µL por poço de

H₂SO₄ 2N. A leitura da placa foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas (Zenyth 200 rt).

O ponto de corte foi estabelecido pela média das densidades ópticas dos soros dos indivíduos esporotriquina negativos (controle negativo) acrescidos duas vezes o desvio padrão em cada diluição e cada tratamento.

3.5.1 Modificações no ensaio imunoenzimático –ELISA

Duas tentativas de melhoria do método no diagnóstico da esporotricose foram realizadas. A primeira consistiu na adição de 100 µL por poço de uma solução de metaperiodato de sódio 40 mM em tampão citrato por 30 minutos a 37 °C em câmara escura após a etapa de sensibilização da placa com antígeno do *S. schenckii*. De acordo com Taborda e Camargo (1994) parte das reações cruzadas ocorre devido epítomos de carboidratos presentes nos antígenos dos fungos e o metaperiodato de sódio possui a propriedade de oxidar esses resíduos de carbonos, diminuindo assim a ocorrência de reação cruzada.

A outra estratégia adotada consistiu na adição de uréia. Este protocolo foi realizado de acordo com Namujju e colaboradores (2011) com algumas modificações, pois pacientes com diferentes infecções podem apresentar anticorpos de alta e baixa afinidade, e a uréia possui a propriedade de quebrar as ligações inespecíficas entre antígeno e anticorpo, diminuindo assim a ocorrência de reação cruzada. A uréia, na concentração de 6M solubilizada em PBS-Tween 0,05 %, foi adicionada, 100 µL/poço, durante 1, 5, 10 e 20 minutos, em temperatura ambiente, após o período de incubação das amostras de soros.

3.6 IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA

O teste de imunodifusão radial dupla foi realizado conforme descrito por Camargo e colaboradores (2003) com algumas modificações. Resumidamente:

adicionou-se 1 mL de ágar a 1 % em água destilada em uma lâmina de vidro para microscopia (25 x 75 mm) e deixou-se esta lâmina secar em estufa a 35 °C por 18 horas. Em seguida, foram pipetados 3,0 mL de ágar a 1 % em solução de NaCl 0,9 % (salina) nas lâminas anteriormente sensibilizadas e estas foram incubadas por 20 minutos em geladeira para a solidificação do ágar. A seguir o ágar foi perfurado com o auxílio de um cilindro metálico de diâmetro pequeno formando na lâmina 7 orifícios, 1 central e 6 ao redor do orifício central, por duas vezes, totalizando 14 orifícios. Nos orifícios centrais foram adicionados cerca de 10 µL do antígeno fúngico (360 µg/mL) e nos orifícios circundantes foram adicionados cerca de 10 µL do soro de coelho, imunizado contra antígenos do *S. schenckii* sem diluir, como controle positivo da reação, e soros de pacientes nas diluições de 1/1 até 1/512 em salina. Após a adição dos reagentes, as lâminas foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 48 horas. Terminado o período de incubação, foi colocado sobre a lâmina um papel de filtro umedecido em água destilada e a lâmina foi imersa em salina e foi incubada à temperatura ambiente por 24 horas, para que o excesso de reagentes fosse removido. Posteriormente, a salina foi descartada. A seguir, foi colocado um novo papel de filtro, umedecido em água destilada e a lâmina incubada em estufa a 37 °C por 24 horas para desidratação do ágar. Com o ágar desidratado, a lâmina foi corada com solução a 0,4 % p/v do corante negro de amido (4 g de amidoschwartz 10B + 100 mL de ácido acético glacial + 900 mL de água destilada) por 10 minutos e depois descorada com ácido acético glacial a 5 % por 10 minutos. Após a descoloração, a lâmina foi colocada em estufa para secagem. Terminado o período de secagem a lâmina foi lida visualmente com a observação da formação de imunocomplexos (linhas de precipitação) que também indicam o título de anticorpo.

3.7 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Pontos de corte foram calculados pela média da densidade óticas acrescidos 2 vezes o desvio padrão dos soros negativos para cada diluição e tratamento e comparados com os soros de pacientes com esporotricose e com soros de pacientes

com PCM. As comparações dos dados foram realizadas no programa “R” (www.r-project.org).

Para cada tratamento foi calculado a especificidade e a sensibilidade de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{verdadeiros positivos (VP)}}{\text{verdadeiros positivos (VP)} + \text{falsos negativos (FN)}} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{verdadeiros negativos (VN)}}{\text{falsos positivos (FP)} + \text{verdadeiros negativos (VN)}} \times 100$$

A partir dos resultados obtidos e utilizando o princípio da curva ROC (Receiver operating characteristic) (ZOU; O'MALLEY; MAURI, 2007), cada tratamento tornou-se um ponto na curva e o tratamento que mais se aproximou do ideal (100% de sensibilidade e 100% de especificidade) foi considerado o melhor para o diagnóstico da esporotricose.

3.8 COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas, CAAE nº 00752212.1.0000.5142.

4 RESULTADOS

4.1 ELETROFORESE DO EXOANTÍGENO DO *Sporothrix schenckii*

O perfil eletroforético do exoantígeno secretado pelo *S. schenckii* isolado Ss118 é mostrado na Figura 8.

Foram dispostas quantidades referentes a 10 μL , 15 μL e 20 μL de exoantígeno do *S. schenckii* por canaleta do gel de poliacrilamida 12%, respectivamente. Após a corrida eletroforética e coloração pela prata, pode-se observar várias bandas com diferentes pesos moleculares, sendo que a banda com peso molecular entre 150 kDa e 66 kDa apresentou maior concentração. Observa-se também que o antígeno encontra-se íntegro.

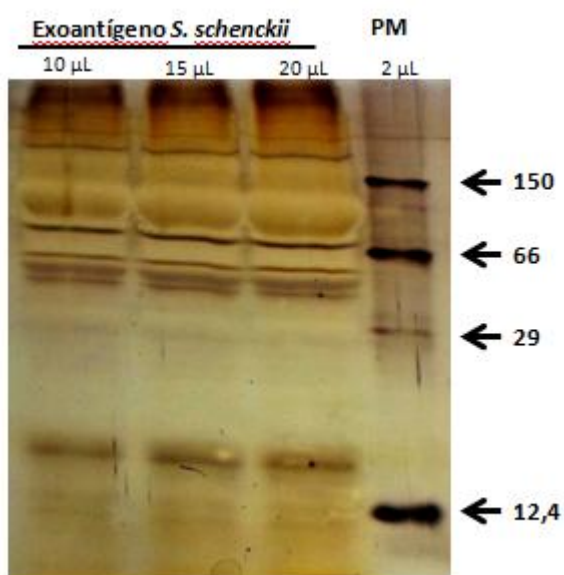


Figura 8 - Perfil proteico do exoantígeno de *S. schenckii* em gel de poliacrilamida a 12% contendo 10, 15 e 20 μL em cada canaleta, respectivamente. PM: padrão molecular.

Fonte: O autor (2012).

4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-*Sporothrix schenckii* EM COELHO

Após a imunização de dois coelhos foi observado que ambos apresentaram resposta positiva com a formação de uma linha de precipitação no ensaio de imunodifusão. O título de anticorpos foi igual a 4 (Figura 9).

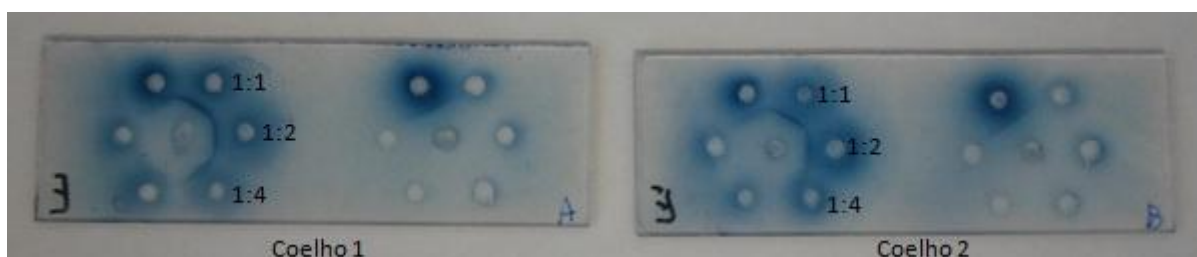


Figura 9 - Imunodifusão radial utilizando soros de coelhos imunizados com antígeno de *S. schenckii*.
Fonte: O autor (2012).

4.3 DOSAGEM DE ANTICORPOS NOS SOROS UTILIZANDO A TÉCNICA IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA

Os resultados do teste de imunodifusão radial dupla são mostrados na Tabela 1. Como se pode observar, 75% das amostras de soros de pacientes com esporotricose foram negativas no teste, sugerindo uma sensibilidade muito baixa. Por outro lado as amostras de soros de pacientes com PCM e soros de indivíduos esporotriquina negativos foram negativos, sugerindo uma alta especificidade.

Tabela 1 - Resultados em percentagem do teste de imunodifusão radial dupla usando soros de diferentes pacientes.

	Imunodifusão radial dupla		
	Positivo	Negativo	Total
Esporotricose	25% (1)	75% (3)	100% (4)
Paracoccidiodomicose	0% (0)	100% (8)	100% (8)
Esporotriquina negativos	0% (0)	100% (11)	100% (11)

Fonte: O autor (2012).

4.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

As médias e desvio padrão das densidades ópticas (D.O.) do ELISA utilizando soros de pacientes com esporotricose, soros de indivíduos esporotriquina negativos e soros de pacientes com PCM são mostrados na Figura 10. Pode-se observar que os soros dos pacientes com esporotricose apresentam uma D.O. mais alta aos antígenos de *S. schenckii* do que a D.O. obtida dos outros dois grupos em todas as diluições testadas. Os soros dos indivíduos esporotriquina negativos e de pacientes com PCM apresentaram considerável reatividade no teste e valores semelhantes entre si. As maiores diferenças foram verificadas nas maiores diluições (1\1600 e 1\3200).

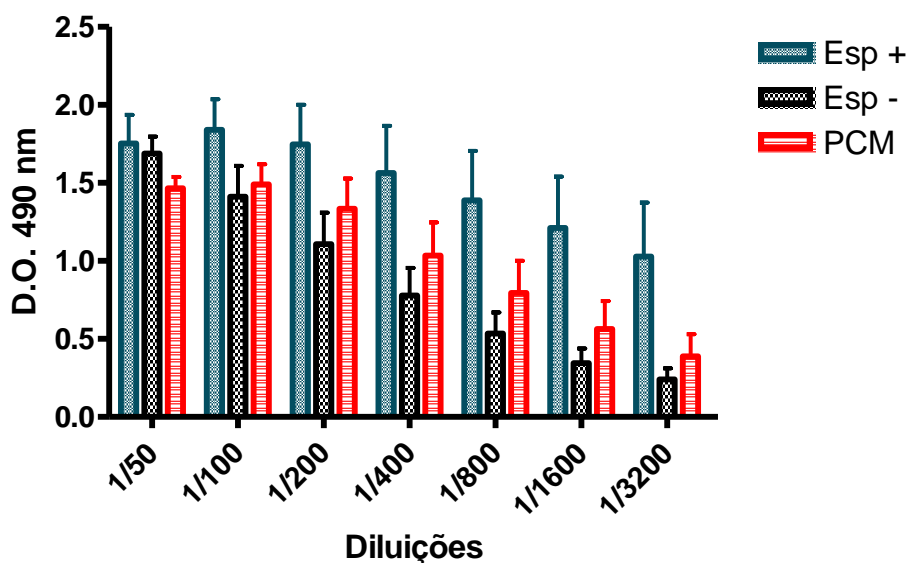


Figura 10 - Médias e desvio padrão das D.O. da ELISA a 490 nm utilizando soros de pacientes com esporotricose (Esp+, n=8), soros de indivíduos esporotriquina negativos (Esp-, n=8) e de soros de pacientes com paracoccidioidomycose (PCM, n=8).

Fonte: O autor (2012).

Como observado anteriormente, os soros de indivíduos negativos e de pacientes com PCM apresentaram reatividade cruzada ao exoantígeno de *S. schenckii*. Parte desta reatividade cruzada pode ser devido epítomos de carboidratos comuns aos dois fungos. Para verificar esta hipótese e melhorar a discriminação entre os diferentes grupos estudados, foi realizado o ensaio de ELISA acrescentando uma etapa com metaperiodato de sódio ao protocolo. O metaperiodato de sódio tem a propriedade de oxidar os resíduos de carboidratos presentes no antígeno diminuindo as reações cruzadas existentes entre os carboidratos (TABORDA; CAMARGO, 1994). Pode-se observar que as D.O. das médias dos soros de pacientes com esporotricose sempre estiveram maiores que as dos outros grupos e que o metaperiodato de sódio não conseguiu diminuir consideravelmente a reatividade cruzada dos pacientes com PCM e dos indivíduos negativos (Figura 11 a e b).

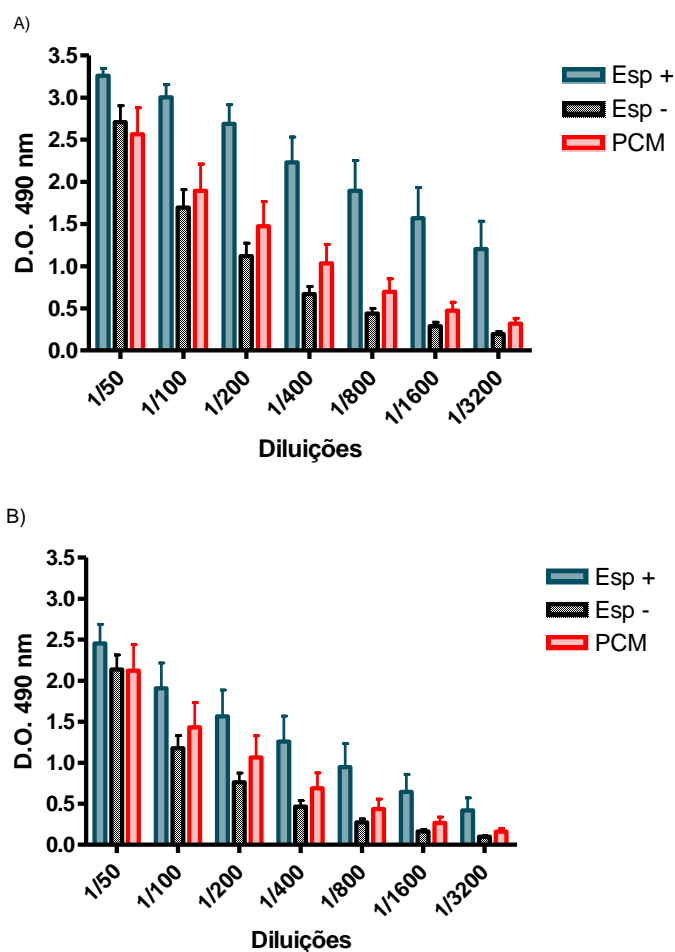


Figura 11 - Médias e desvio padrão das D.O. da ELISA a 490 nm utilizando soros de pacientes com esporotricose (Esp+, n=8), soros de indivíduos esporotriquina negativos (Esp-, n=8) e soros de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM, n=8) na ausência (A) ou presença de metaperiodato (B).

Fonte: O autor (2012).

Dados da literatura indicam que, além de anticorpos anticarboidratos, pacientes com diferentes infecções podem apresentar anticorpos de baixa e alta especificidade (NAMUJJU et al., 2011; RAHBARI et al., 2012). Para verificar a participação de anticorpos de baixa e alta especificidade na ligação ao exoantígeno de *S. schenckii* e obter uma melhor discriminação entre os grupos testados, foi utilizado no ELISA, uma etapa com uréia na concentração de 6M em diferentes tempos de incubação, pois a uréia possui a propriedade de quebrar ligações inespecíficas entre antígeno e anticorpo. A Figura 12 mostra as médias das densidades ópticas (D.O.) em diferentes tempos de incubação com uréia. A análise

dos dados sugere que o tratamento com uréia diminuiu as D.O. dos soros de todos os grupos, principalmente nos tempos 5, 10 e 20 minutos de tratamento com a uréia e também que causa uma redução drástica dos valores de D.O. dos soros de indivíduos esporotriquina negativos e de pacientes com PCM.

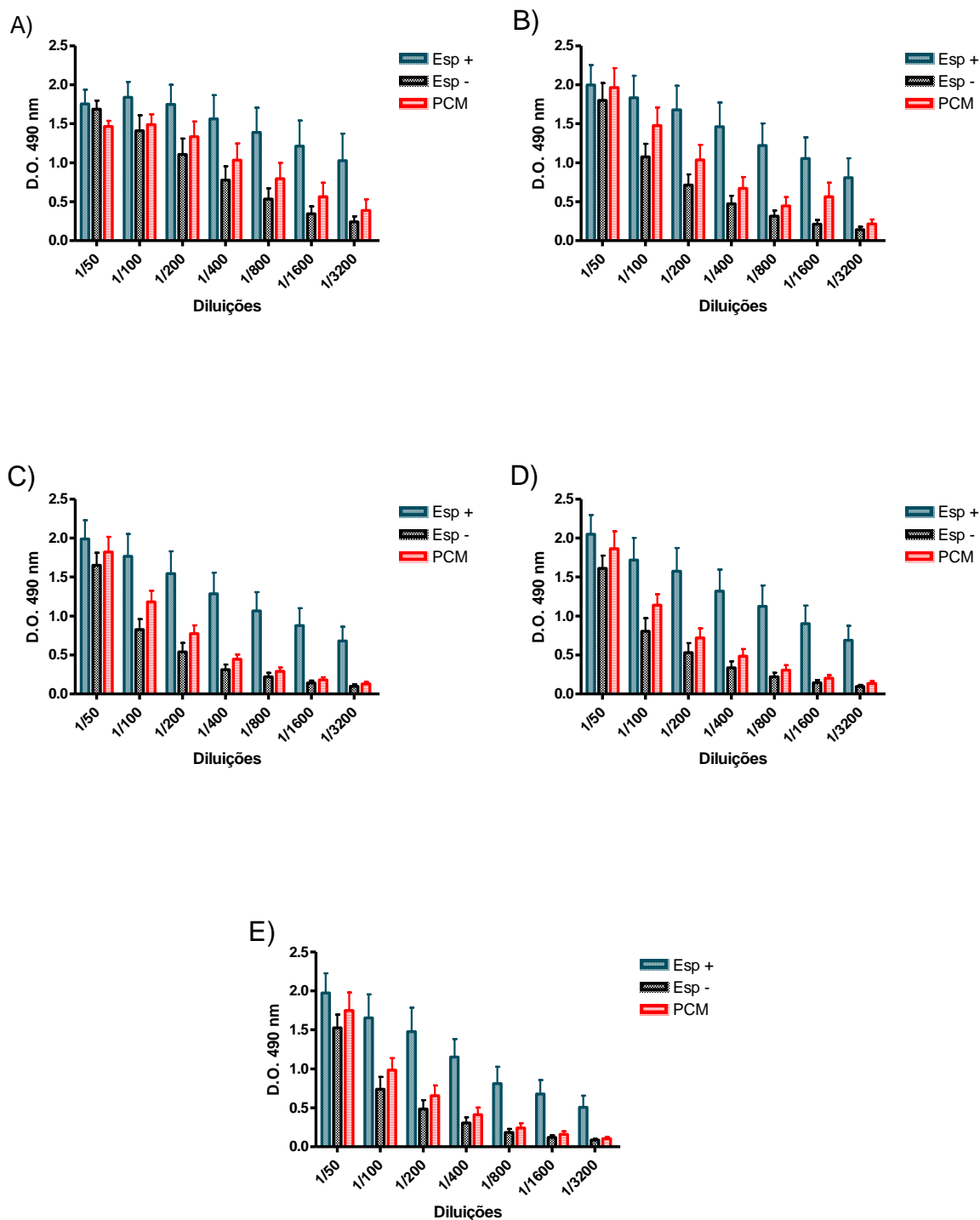


Figura 12 - Médias das D.O. do ELISA a 490 nm dos soros sem tratamento com uréia (A), com o tratamento de 1 minuto com uréia (B), com tratamento de 5 minutos com uréia (C), com tratamento de 10 minutos com uréia (D), com tratamento de 20 minutos com uréia (E). Esp+: soros de pacientes com esporotricose (n=8). Esp-: soros de indivíduos esporotriquina negativos (n=8). PCM: soros de pacientes com paracoccidioidomicose (n=8).

Fonte: O autor (2012).

Com objetivo de se obter a melhor discriminação no ensaio de ELISA entre os soros dos pacientes com esporotricose e dos outros dois grupos em termos de diluição e tratamento com metaperiodato e uréia, foram realizadas curvas onde se comparou os valores de sensibilidade e especificidade em cada tratamento utilizando o ponto de corte a partir dos soros esporotriquina negativos (Figuras 13 e 14 respectivamente).

Pode ser observado que o tratamento com o metaperiodato não melhorou o desempenho do teste, pois o ELISA sem utilizar o metaperiodato de sódio (controle) obteve maiores valores de sensibilidade e especificidade em relação ao protocolo com a etapa do metaperiodato. As melhores discriminações tratando o antígeno com metaperiodato de sódio foram nas diluições de 1\1600 e 1\3200 (Figura 13). Por sua vez, o tratamento com uréia melhorou o desempenho do ensaio de ELISA, ou seja, o protocolo com a etapa da uréia, em determinadas diluições e tempos, obteve valores superiores de sensibilidade e especificidade em relação ao protocolo controle. A melhor discriminação foi obtida na diluição de 1\1600 nos tempos de 5, 10 e 20 minutos. Além disso, as combinações diluição/tempo: 1\200/20 min, 1\400/20 min, 1\3200/10min e 1\800/5min foram estatisticamente (e numericamente) iguais às melhores combinações da diluição 1\1600 (Figura 14).

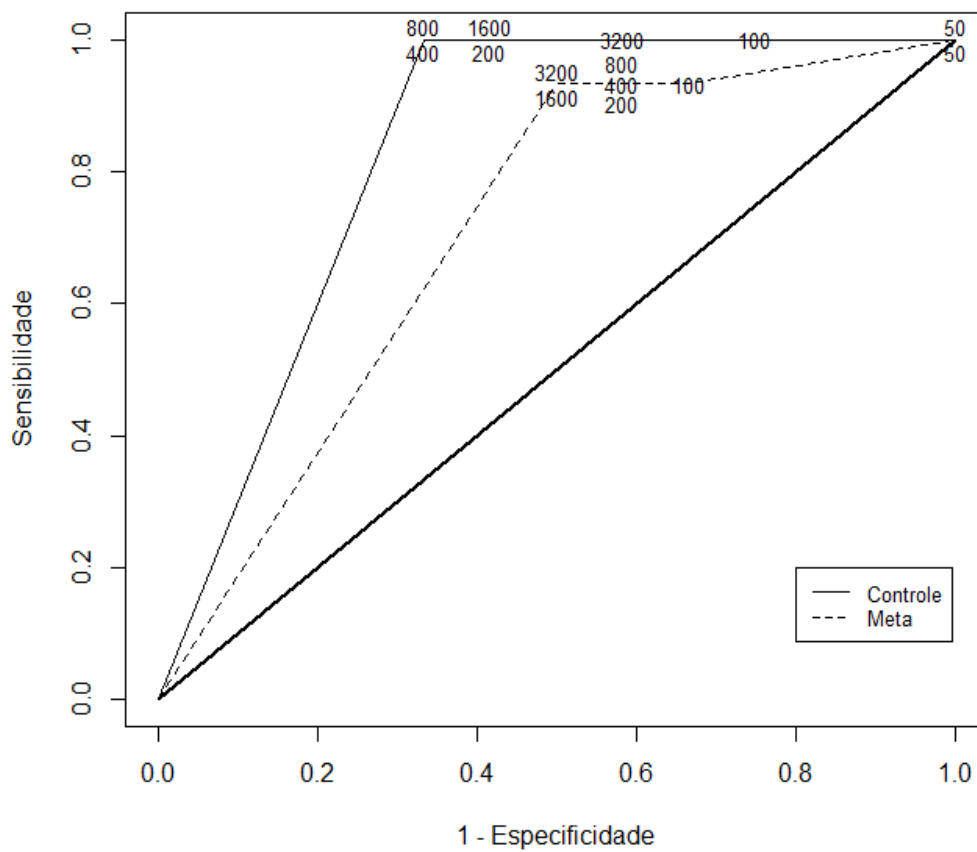
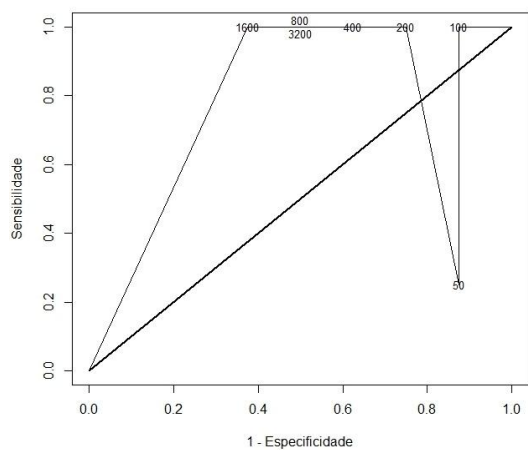
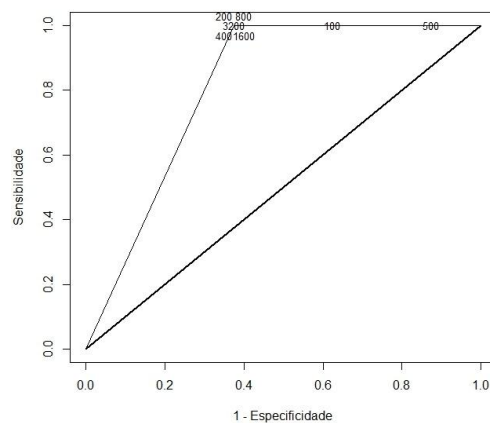


Figura 13 - Curvas ROC comparando diferentes diluições dos soros e a adição ou não de metaperiodato de sódio.
 Fonte: O autor (2013).

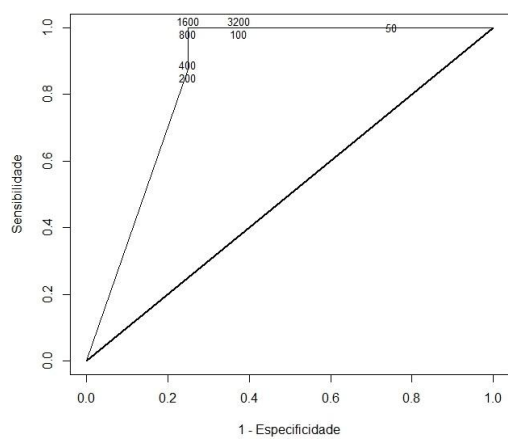
A)



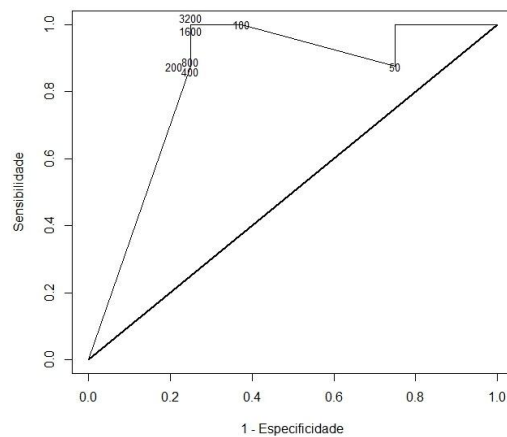
B)



C)



D)



E)

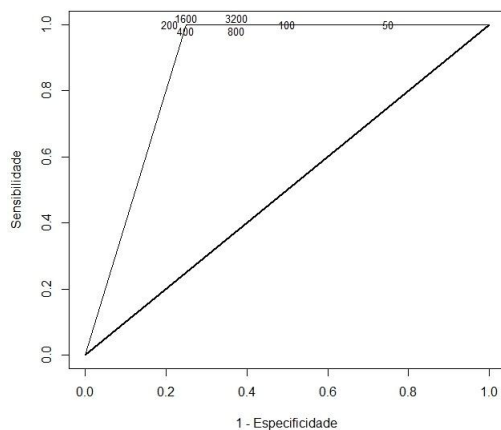


Figura 14: Curvas de ROC para cada diluição dos soros sem o tratamento com uréia (A), com o tratamento de 1 minuto com uréia (B), com tratamento de 5 minutos com uréia (C), com tratamento de 10 minutos com uréia (D) e com tratamento de 20 minutos com uréia (E).

Fonte: O autor (2013).

5 DISCUSSÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea com distribuição em todo o mundo. É causada pela inoculação traumática com material contaminado com o fungo ambiental *S. schenckii* (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA, SCHUBACH, COSTA, 2006; RAMOS-e-SILVA et al., 2007; SCHETMAN, 2010a). Na América Latina é uma das micoses mais comuns. Na América do Sul sua incidência anual estimada é de 48 a 60 casos por cem mil habitantes, sendo que o número de casos envolvendo homens e mulheres varia de região para região (CONTI-DÍAZ, 1989; VÁSQUEZ-del-MERCADO, ARENAS, PADILLA-DESGARENES, 2012).

O diagnóstico definitivo desta doença infecciosa é feito pelo isolamento do fungo em cultura com ágar Sabouraud. No entanto, o resultado final do exame demora dias. Além disso, existe o risco de contaminação da cultura, e é necessário um profissional treinado para fazer a correta identificação do fungo. Outro problema é a ocorrência de resultado falso negativo em virtude da dificuldade de crescimento do fungo em meio de cultura (SCHETMAN, 2010b; VÁSQUEZ-del-MERCADO, ARENAS, PADILLA-DESGARENES, 2012).

Diante das dificuldades mencionadas acima, o desenvolvimento de técnicas imunológicas baseadas na detecção de anticorpos dos pacientes são muito importantes no diagnóstico auxiliar desta patologia, pois são técnicas que permitem um resultado mais rápido, facilitando assim o diagnóstico e o acompanhamento do paciente. Possibilita também conhecer a prevalência real dessa doença.

Técnicas de precipitação ou aglutinação de complexos antígeno-anticorpo para a detecção de anticorpos anti-*S. schenckii* foram propostas por BLUMER e colaboradores (1973). Estes autores encontraram baixos valores de sensibilidade e valores satisfatórios de especificidade. Neste trabalho, o resultado da imunodifusão radial dupla apresentou baixa sensibilidade para esporotricose (25%) e alta especificidade (100%) para PCM e indivíduos esporotriquina negativos (Tabela 1), estando de acordo com os achados de Blumer e colaboradores (1973) e com os achados de Fernandes e colaboradores (2011).

Os ensaios imunoenzimáticos, em geral, apresentam um limiar de detecção maior que os métodos de aglutinação ou precipitação e, conseqüentemente, maior sensibilidade e especificidade.

Na literatura existe uma variedade de ensaios imunoenzimáticos descritos para o diagnóstico de infecções causadas por outros fungos dimórficos, como histoplasmose e PCM. Entretanto, a técnica de ELISA tradicional não apresentou sensibilidade e especificidade satisfatórias para o diagnóstico dessas doenças. (GUIMARÃES et al., 2004; ALBUQUERQUE; MARQUES da SILVA; CAMARGO, 2005).

Para o diagnóstico da esporotricose, até o presente momento, foram publicados seis trabalhos que utilizaram ensaios imunoenzimáticos. Desses, cinco trabalhos pesquisando imunoglobulinas G (IgG) e um pesquisando imunoglobulinas G, M e A. O primeiro trabalho publicado foi de Scott e Muchmore (1989). Esses pesquisadores desenvolveram um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da esporotricose utilizando antígeno da forma leveduriforme do *S. schenckii*, e obtiveram alto valor de sensibilidade, mas baixo de especificidade no teste. De forma semelhante ao trabalho apresentado por Scott e Muchmore (1989), no presente trabalho, utilizamos o antígeno da forma leveduriforme, com proteína de maior concentração com peso aproximado de 118 kDa (Figura 8). Optou-se por utilizar antígeno da forma leveduriforme, pois é a forma que causa a infecção no paciente, aumentando assim a detecção específica dos anticorpos.

Em 2005, Bernardes-Engemann e colaboradores desenvolveram uma técnica de ELISA utilizando uma preparação antigênica purificada da parede celular, denominada SsCBF, preparada através de cromatografia de afinidade em coluna, obtendo 90% de sensibilidade e 86% de eficiência em seus resultados (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2005 apud LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). Visando diminuir os gastos com a preparação do antígeno desenvolvida por Bernardes-Engemann e colaboradores (2005), Almeida-Paes e colaboradores (2007a) desenvolveram uma ELISA para diagnóstico da esporotricose utilizando extrato bruto de cultivo de forma filamentosa de *S. schenckii*, e obtiveram 97% de sensibilidade e 89% de especificidade. O mesmo grupo também pesquisou a presença de IgG, IgM e IgA em pacientes com esporotricose sem tratamento e durante o tratamento com itraconazol e concluíram que IgM e IgA também participam da patogenia da esporotricose (ALMEIDA-PAES et al., 2007b). Entretanto, todos esses trabalhos obtiveram reações-cruzadas com outras doenças causadas por fungos.

Em 2011, Fernandes e colaboradores padronizaram um ELISA para diagnóstico da esporotricose em gatos e, para isso, testaram a utilização de antígeno específico (SsCBF) do *S. schenckii* e a utilização de extrato bruto de exoantígeno. A utilização de extrato bruto obteve melhores resultados, com sensibilidade de 96 % e especificidade de 98 %.

A Figura 10 mostra os resultados da D.O. dos soros de pacientes com esporotricose, pacientes com PCM e soros de indivíduos esporotriquina negativos. Pode-se observar uma alta reatividade ao antígeno empregado entre soros de pacientes com PCM e de indivíduos esporotriquina negativos, principalmente nas diluições de 1\50 a 1\800, resultados semelhantes aos encontrados por Almeida-Paes e colaboradores (2007a, b) e Scott e Muchmore (1989).

Uma estratégia encontrada por alguns pesquisadores para diminuir ou eliminar as reações inespecíficas foi o tratamento do antígeno com metaperiodato de sódio para quebrar epítomos de carboidratos do antígeno, que podem ser responsáveis pelas reações cruzadas, o que levou a um aumento considerável da sensibilidade e da especificidade no diagnóstico da histoplasmose (GUIMARÃES et al., 2004) e da PCM (ALBUQUERQUE; MARQUES da SILVA; CAMARGO, 2005). Entretanto, no presente trabalho, para o diagnóstico da esporotricose, a estratégia de tratamento do antígeno com metaperiodato de sódio não melhorou a discriminação entre os soros de pacientes com esporotricose com relação aos demais outros grupos (Figura 11). A avaliação da especificidade e da sensibilidade pela curva de ROC, como apresentado na Figura 13 confirmam estes achados.

Como disponível na literatura, anticorpos de baixa afinidade podem ser responsáveis pelas reações cruzadas. A afinidade e/ou avidéz de anticorpos podem ser avaliados pela adição de uréia 6M. Namujju e colaboradores (2011) realizaram ELISA na presença de solução de uréia 6M por 5 minutos para identificar anticorpos de baixa avidéz de IgG em pacientes com infecções por papilomavírus humano e os resultados mostraram que uma quantidade significativa de mulheres apresentavam anticorpos de baixa avidéz. Por sua vez, Rahbari e colaboradores (2012) demonstraram que os valores de avidéz de IgG é capaz de diferenciar toxoplasmose aguda de crônica.

Outra estratégia empregada neste trabalho foi a inclusão de uma nova etapa na técnica de ELISA, utilizando uma solução de uréia 6M, pois esta (uréia) tem a

propriedade de quebrar as ligações de baixa afinidade entre antígeno-anticorpo, ligações estas responsáveis pelas reações inespecíficas.

A Figura 12 mostra os resultados da ELISA utilizando solução de uréia 6M em diferentes tempos de incubação. A adição de uréia foi capaz de diminuir drasticamente os valores de D.O. dos soros de indivíduos esporotriquina negativos e de pacientes com PCM. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura apresentados acima, pois esses dados revelam que as ligações inespecíficas de antígeno-anticorpo foram quebradas. A avaliação da curva de ROC comparando as sensibilidade e especificidade da ELISA utilizando os pontos de corte em cada tratamento mostrou ser esta estratégia adequada ao diagnóstico da esporotricose (Figura 14). As melhores combinações da diluição do soro x tempo de incubação com a uréia foram 1\200/20 min, 1\400/20 min, 1\800/5min, 1\3200/10min e 1\1600 por 5, 10 e 20 min. Portanto, a estratégia utilizando uréia aumentou a sensibilidade e a especificidade do teste para o diagnóstico da esporotricose.

Estamos cientes que o pequeno número de amostras de pacientes com esporotricose consiste em uma limitação do presente trabalho. No entanto, isto não inviabiliza os resultados aqui apresentados.

6 CONCLUSÃO

- O ensaio de imunodifusão radial dupla para o painel de soros apresentou baixo valor de sensibilidade (25%) e alto de especificidade (100%) no diagnóstico da esporotricose.
- O teste ELISA tradicional apresentou baixo valor de especificidade no diagnóstico da esporotricose.
- A estratégia de uso do metaperiodato de sódio no teste ELISA mostrou-se ineficiente em discriminar os soros de pacientes com esporotricose de soros de pacientes com paracoccidiodomicose e soros de indivíduos esporotriquina negativos.
- A estratégia de uso da uréia 6M no teste de ELISA mostrou-se eficiente em discriminar os soros de pacientes com esporotricose de soros de pacientes com paracoccidiodomicose e soros de indivíduos esporotriquina negativos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C.F.; MARQUES da SILVA, S.H.; CAMARGO, Z.P. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v.43, n.4, Apr, p.1944-6, 2005.

ALMEIDA-PAES, R. et al. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. **Clin Vaccine Immunol**, v.14, n.3, Mar, p.244-9, 2007a.

_____. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. **Clin Vaccine Immunol**, v.14, n.9, Sep, p.1149-57, 2007b.

BANGS, L.B. New developments in particle-based immunoassays: introduction. **Pure & Appl Chem**, vol. 68, n.10, p.1873-79, 1996.

BARROS, M.B.L. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Men Inst Oswaldo Cruz**, vol. 96, p. 777-79, 2001.

BARROS, M. B. L. et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Dermatol**, v. 42, p. 677-81, 2003.

BARROS, M. B. L. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin Infect Dis**, v.38, n.4, Feb 15, p.529-35, 2004.

BARROS, M.B.L.; ALMEIDA-PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin Microbiol Rev**, v.24, n.4, p. 633-654, 2011.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. **Med Mycol**, v.43, p. 487-493, 2005. Apud LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **An Acad Bras Cienc**, v. 78, p. 293-308, 2006.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. A comparative serological study of the SsCBF antigenic fraction isolated from three *Sporothrix schenckii* strains. **Med Mycol**, v. 47, n. 8, p.874-878, 2009. Apud FERNANDES, G. F. et al. Serodiagnosis

of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 445-9, 2011.

BLUMER, S. O. et al. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. **Appl Microbiol**, v.26, n.1, Jul, p.4-8, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, May 7, p.248-54, 1976.

CAMARGO, Z. P. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythroimmunoassay. **Mycopathologia**, v. 88, p. 31-37, 1984.

CAMARGO, Z. P. et al. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Med Mycol**, v. 41, p. 539-542, 2003.

CONTI-DIAZ, I. A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v.108, n.2, Nov, p.113-6, 1989.

DAVIS, B. A. Sporotrichosis. **Dermatol Clin**, v.14, n.1, Jan, p.69-76, 1996.

FERNANDES, G. F. et al. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 445-9, 2011.

FIGUEIREDO, C. C. et al. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial Pathogenesis**, v.36, p. 177-188, 2004.

GARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clin. Microbiol Rev**, v. 12, p. 454-500, 1999.

GUIMARÃES, A. J. et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. **J Med Microbiol**, v.53, n.Pt 6, Jun, p.509-14, 2004.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **J Exp Med**, v.5, n.1, Oct 1, p.77-89, 1900.

ITOH, M.; OKAMOTO, S.; KARIYA, H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. **Dermatologica**, v.172, n.4, p. 209-13, 1986.

KOHLER, L.M.; HAMDAN, J.S.; FERRARI, T.C.A. Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and in vitro analysis for antifungal susceptibility testing. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.58, n.1, May, p.117-20, 2007.

KONG, X. et al. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clin Microbiol Infect**, v.12, p. 1077-1081, 2006.

LOPES, J.O. et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, vol. 32, n.5, 1999.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **An Acad Bras Cienc**, v. 78, p. 293-308, 2006.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para conhecimento da assim chamadas esporotricoses. **Rev Med**, São Paulo, n. 21, p. 433-450, 1907.

MARQUES, S.L et al. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): Trasmissão humana. **Rev Inst Med Trop**, v. 35, p. 327-330, 1993.

MESA-ARANGO, A.C et al. Phenotyping and Genotyping of *Sporothrix schenckii* Isolates According to Geographic Origin and Clinical Form of Sporotrichosis. **J Clin Microbiol**, v.40, n.8, Aug, p.3004-11, 2002.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clin Exp Dermatol**, v.27. p. 427-431, 2002.

NAMUJJU, P. B. et al. Low avidity of human papillomavirus (HPV) type 16 antibodies is associated with increased risk of low-risk but not high-risk HPV type prevalence. **BCM Res Notes**, v.4, p.170, 2011.

RAMOS-e-SILVA, M. R. et al. Sporotrichosis. **Clin Dermatol**, v.25, n.2, Mar-Apr, p. 181-7, 2007.

RAHBARI, A. H. et al. IgG avidity ELISA test for diagnosis of acute toxoplasmosis in humans. **Korean J Parasitol**, v.50, n.2, Jun, p. 99-102, 2012.

SCHECHTMAN, R.C. Sporotrichosis: Part I. **Skinmed**, v.8, n.4, Jul-aug, p.216-20, 2010a.

_____. Sporotrichosis: Part II. **Skinmed**, v.8, n.5, Sep-Oct, p.275-80, 2010b.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by fungus possibly related to the sporotricha. **Johns Hopkins Hosp Bull**, v.9, p.286-90, 1898. Apud RAMOS-e-SILVA, M. R. et al. Sporotrichosis. **Clin Dermatol**, v.25, n.2, Mar-Apr, p. 181-7, 2007.

SCOTT, E. N.; MUCHMORE, H. G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol**, v.27, n.2, Feb, p.300-4, 1989.

SILVEIRA-GOMES, F. et al. Development and evaluation of látex agglutination test for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Vaccine Immunol**, vol. 18, p. 604-608, 2011.

STERLING, J.B.; HEYMANN, W.R. Potassium iodide in dermatology: A 19th century drug for the 21st century – Uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. **J Am Acad Dermatol**, v.43, n.4, Oct, p.691-7, 2000.

TABORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. Diagnosis of Paracoccidioidomycoses by Dot Immunobinding Assay for Antibody Detection Using the Purified and Specific Antigen gp 43. **J Clin Microbiol**, v.32, n.2, Feb, p.554-6, 1994.

TRILLES, L. et al. In vitro antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.9, Sep, p.3952-4, 2005.

VASQUEZ-del-MERCADO, E.; ARENAS, R.; PADILLA-DESGARENES, C. Sporotrichosis. **Clin Dermatol**, v.30, n.4, Jul, p.437-43, 2012

VIDOTTO, Valério. **Manual de micologia médica**. São Paulo : Tecmedd, 2004.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J Biol Chem**, v. 224, n.16, Aug 25, p.4406-12, 1969.

ZOU, K.H.; O'MALLEY, A.J.; MAURI, L. Receiver-Operating Characteristic Analysis for Evaluation Diagnostic Tests and Predictive Models. **Circulation**, v.115, p. 654-657, 2007.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Alfenas/MG – CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Inquérito soro-epidemiológico da esporotricose em áreas rurais do município de Alfenas, MG

Coordenador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias
Telefone do Laboratório de Microbiologia da Unifal: (35) 32991305
Telefone do Comitê de Ética da Unifal: (35) 32991318

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar através de um teste sorológico chamado de ELISA a presença de anticorpos para a esporotricose. A esporotricose é uma micose cutânea caracterizada por lesões na pele e no tecido subcutâneo ocasionada pela inoculação do *Sporothrix schenckii*. Isto se dá frequentemente por um trauma mecânico. Partes do fungo podem estar junto ao solo, em árvores, arbustos, troncos, espinhos, etc, e a pessoa ao se ferir, pode introduzir o fungo na pele ocasionando feridas ou nódulos. A pessoa pode ou não desenvolver a doença ou tê-la sob a forma silenciosa.

Esse trabalho faz parte de uma pesquisa envolvendo a Universidade Federal de Alfenas. Para realizar este projeto, necessita-se de sangue para realização do teste. O soro da pessoa será comparado a de uma outra que apresenta a doença. Desta forma pode-se saber se você já entrou em contato com o fungo, mas não quer dizer que você tem a doença.

Antes de aceitar participar da pesquisa, leia atentamente as explicações abaixo que informam sobre o procedimento. Você poderá recusar a participar da pesquisa e poderá abandonar o procedimento em qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo.

A sua participação envolverá a inoculação de esporotriquina na pele, cujo sinais clínicos da reação podem causar inflamação local após 72 horas da inoculação do antígeno, e posteriormente a retirada de sangue em veia periférica, local onde normalmente é coletado sangue para exames de rotina. A coleta será realizada exclusivamente com material descartável, ou seja, utilizável uma única vez, reduzindo os riscos de qualquer contaminação e por profissional treinado. A punção venosa para coleta de sangue causa leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento.

A participação, como voluntário, não auferirá nenhum privilégio, seja ele de caráter financeiro ou de qualquer natureza, podendo esta participação ser excluída do projeto em qualquer momento sem prejuízo ao seu responsável.

Toda informação e os resultados obtidos serão tratados de forma sigilosa e arquivada e apenas as pessoas envolvidas no estudo terão acesso a estas informações.

Na apresentação dos resultados não serão citados o seu nome ou do participante pelo qual você é responsável.

Agradecemos desde já, sua participação.

Confirmo ter revisado o conteúdo deste termo. A minha assinatura abaixo indica o meu consentimento em participar desta pesquisa.

Alfenas, ____ de _____ de 20

Assinatura do participante ou responsável

Assinatura do pesquisador

APENDICE B – Curvas de ROC sobrepostas para o tratamento dos soros com uréia 6M