

TITULAÇÃO DE SORO DE FELINOS POSITIVOS PARA ESPOROTRICOSE ATRAVÉS DO TESTE DE ELISA INDIRETO

CAROLINA OLIVEIRA DA SILVA¹; SERGIO JORGE²; MARTHA BRAVO CRUZ
PIÑEIRO³; SABRINA DE OLIVEIRA CAPELLA⁴; TATIÉLEN SEVERO⁵; FÁBIO
PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹ Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas –
carolinaosilva96@gmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas –
sergiojorgevet@hotmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas –
martha.pineiro@hotmail.com

⁴ Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas –
capelas.oliveira@gmail.com

⁵ Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas –
tatihsevero@gmail.com

⁶ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas –
fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é caracterizada como micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix* (MORGADO et al., 2022). O fungo se encontra em solos e vegetais, e sua transmissão pode ocorrer através de materiais contaminados, por exemplo espinhos e farpas. Além disso, animais que se encontram infectados, principalmente felinos, podem ser transmissores da doença através de arranhaduras, mordidas ou contato direto com pele que já está com lesão (SILVA; NEGRINI, 2023). A esporotricose geralmente se apresenta em forma de pápulas ou pústulas, podendo haver formação de nódulos ulcerados que envolvem vasos linfáticos locais. As lesões podem ser classificadas em cutânea, pulmonar e disseminada, sendo a forma cutânea a de maior ocorrência (SIZAR; TALATI, 2022).

O gato doméstico é considerado o hospedeiro mais suscetível à infecção pelo *Sporothrix brasiliensis*, desenvolvendo formas clínicas graves. Para o tratamento ser eficiente, depende de alguns fatores como estado geral do animal, terapia utilizada, além de questões sócio/econômicas e especialmente, depende da interação do fungo com o hospedeiro e, por esses motivos, falhas no tratamento são consideradas comuns (GREMIÃO et al., 2022). Considerando que, atualmente não existe uma vacina comercialmente disponível contra a infecção e as opções para o diagnóstico e tratamento são limitadas, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da doença (TÉLLEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

Diante do exposto, nosso grupo desenvolveu um antígeno quimérico multiepítomos visando o desenvolvimento de um novo ensaio de diagnóstico indireto bem como a profilaxia da esporotricose felina. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é titular IgG total presente soro de gatos positivos para esporotricose através de ELISA indireto, utilizando proteína recombinante como antígeno.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção da proteína: As proteínas SsEno e Gp70, oriundas da cepa de *Sporothrix schenckii* ATCC 58251, foram selecionadas para a construção de uma proteína quimérica recombinante. Para isso, as sequências codificadoras (CDS)

das foram depositadas e analisadas por ferramentas e softwares de bioinformática. Os genes contendo a sequência codificadora para a quimera foram sintetizados por uma empresa privada e clonado no vetor pET28a. Para a expressão da quimera recombinante foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* BL21 Star™.

2.2 Anticorpo: Felinos apresentando sinais clínicos compatíveis com a esporotricose foram avaliados e realizada a coleta de material biológico para cultura micológica, considerado o padrão-ouro para o diagnóstico desta enfermidade. No mesmo momento, foram realizadas coletas sanguíneas para exames complementares de rotina e uma alíquota do soro foi separada por centrifugação e armazenado a -20 °C até o momento de sua utilização. Para este estudo, foi realizado um *pool* de soros de cinco gatos positivos para a esporotricose.

2.3 Western blot: A proteína recombinante foi caracterizada através das técnicas de SDS-PAGE e *Western blot*. A proteína purificada e os controles positivo e negativo foram submetidas à técnica de SDS-PAGE 12% seguido de eletrotransferência para duas membranas de nitrocelulose. Nesta etapa, uma das membranas foi incubada com o anticorpo monoclonal anti-6xHistidina conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), na diluição de 1:10.000. Para avaliar a antigenicidade da proteína recombinante, a outra membrana foi incubada com *pool* soros de felinos com diagnóstico positivo, a partir da cultura micológica, para esporotricose convalescente na diluição 1:500 por 1 h seguido da adição de anticorpo secundário anti-IgG gato conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1:5.000. Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente sob agitação orbital por 1 h, entre cada etapa as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e reveladas com solução cromógena composta por 6 mg de tetrahydroclorato de diaminobenzidina (DAB), 15 µl de H₂O₂ 30%, 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6 e 1 mL de sulfato de níquel 0,3% (NiSO₄) até o desenvolvimento da cor.

2.4 ELISA e titulação do anticorpo: A padronização do ELISA foi realizada previamente por nosso grupo de pesquisa. Para a titulação, placas de microtitulação de poliestireno (Nunc Polysorp, Nalge Nunc International, Rochester, NY, EUA) com 96 poços foram sensibilizadas em triplicatas com 50 ng da proteína recombinante por poço e incubada a 4 °C *overnight*. Após esse período, foi realizada a lavagem da placa três vezes com PBS-T. Na próxima fase foi realizado o bloqueio da placa, onde foi adicionado em cada poço 200 µl de leite desnatado 5% diluído em PBS e incubado a 37 °C por 2 horas. Após nova lavagem, as placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C com 200µl de soros de gatos diagnosticados com esporotricose na diluição seriada de 1:50 a 1:102.400 em PBS-1x. Após, foi feita a lavagem e adicionado conjugado de IgG anti-felino com peroxidase (anti-cat IgG Sigma-Aldrich®) diluído a 1:5000 em PBS-1x. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e lavado logo após este período. A reação foi revelada pela adição de uma solução contendo 0,004g o-fenilenodiamina dicloridrato em 10ml de tampão citrato fosfato (pH 4,0) e 15µl e H₂O₂ 30V por 15 minutos, à temperatura ambiente, em local escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50µl de H₂SO₄ 3% por poço. A absorbância foi avaliada por meio de um leitor de microplacas de ELISA (Agilent BioTek 800 TS Absorbance Reader, Santa Clara, CA, USA) a 490nm. Foi utilizado a média dos valores obtidos através da triplicata. O título foi estabelecido como a maior diluição do anticorpo em que ainda é possível visualizar a reação colorimétrica de antígeno-anticorpo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da proteína recombinante por meio da técnica de Western Blot, apresentando o tamanho esperado de aproximadamente 60 kDa (Figura 1.A). A proteína recombinante demonstrou sua antigenicidade ao ser reconhecida por soros de felinos positivos para esporotricose (Figura 1.B).

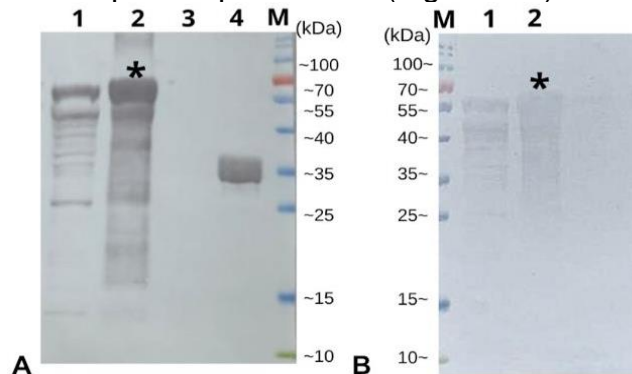


Figura 1: Western Blot da caracterização da proteína recombinante.

A: Anti-histidina: 1- *E. coli* transformada induzida; 2- Proteína recombinante purificada; 3 - Controle negativo (*E.coli* BL21 (DE3) não transformada); 4- Controle positivo (rLipL32 de *Leptospira interrogans* produzida em *E. coli*); M- Marcador de peso molecular (Thermo Scientific). **B:** Soro felino convalescente: M- Marcador de peso molecular (Thermo Scientific). 1- *E. coli* transformada induzida; 2 - Proteína recombinante purificada; 3- Controle negativo (*E.coli* BL21 (DE3) não transformada). * indica a banda da proteína recombinante.

No teste ELISA indireto, a partir da titulação do pool de soros obtido de felinos positivos para esporotricose, a proteína recombinante foi reconhecida até a diluição de 1:1.600 (Figura 1).

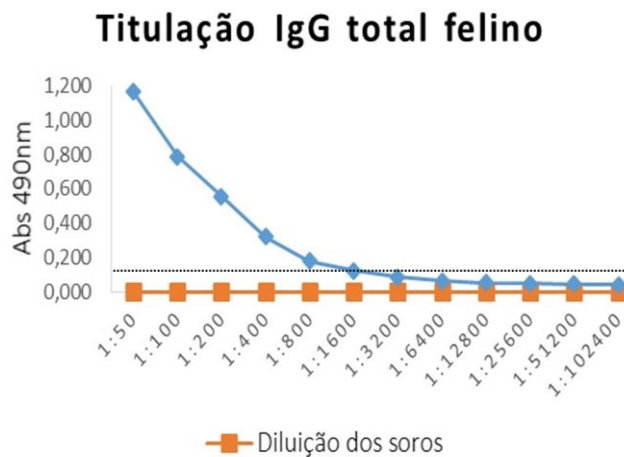


Figura 2: Titulação de soros positivos para esporotricose. Os dados representam titulação por ELISA indireto de um *pool* de soros de gatos positivos para esporotricose, utilizando a proteína quimérica como antígeno.

Os resultados do presente estudo sugerem que os anticorpos da classe IgG presente no soro de gatos positivos para esporotricose reconhecem a proteína recombinante até a diluição de 1:1600. Nesse estudo preliminar utilizamos um pool de soros de felinos infectados em diferentes estágios da doença, contudo, a titulação individual deverá ser realizada em estudos futuros considerando o estadiamento dos animais.

Observamos que mesmo em altas diluições do soro (até 1:1600) a proteína recombinante é capaz de gerar reação com anticorpos de animais positivos, isso porque o ELISA indireto é um teste quantitativo, baseado em respostas formadas em decorrência da ligação antígeno-anticorpo (FINDLAY et al., 2000). Dessa forma, o antígeno desenvolvido nesse estudo mostra-se promissor para o desenvolvimento de um novo insumo contra a esporotricose felina.

Diante do exposto, podemos constatar que a proteína recombinante utilizada no ELISA indireto é reconhecida por soros de felinos naturalmente infectados pelo *Sporothrix spp.* Soros de animais infectados com outras micoses cutâneas e/ou sistêmicas devem ser avaliados em estudos futuros para verificar a especificidade do antígeno, aqui avaliado.

4. CONCLUSÕES

Os soros de gatos positivos para esporotricose, demonstraram ter capacidade de reconhecer a proteína recombinante até a diluição de 1:1600 indicando seu potencial antigênico. Novos estudos são necessários para a padronização e validação de um ensaio de diagnóstico indireto bem como a avaliação deste antígeno em formulações vacinais contra a esporotricose felina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FINDLAY, J.W., SMITH, W. C., LEE, J.W., NORDBLOM, G.D., DAS, I., DESILVA, B.S., KHAN, M.N., BOWSHER, R.R. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. 2000 Jan;21(6):1249-73. doi: 10.1016/s0731-7085(99)00244-7

GREMIÃO, I. D. F., de MIRANDA, L. H. M., PEREIRA-OLIVEIRA, G. R., MENEZES, R. C., de SÁ MACHADO, A. C., RODRIGUES, A. M., & PEREIRA, S. A. Advances and challenges in the management of feline sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2022.

MORGADO, D. S., CASTRO R., RIBEIRO-ALVES M., CORRÊA-MOREIRA D., CASTRO-ALVES J., PEREIRA S. A., MENEZES, R. C., OLIVEIRA, M. M. E. Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix sp.* identified using molecular tools. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100140, 2022.

SILVA G. L. da; NEGRINI L. K. de O. Esporotricose em felinos domésticos: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 21, 2023.

SIZAR, O., TALATI, R. Sporotrichosis. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

TÉLLEZ-MARTÍNEZ, D., Batista-Duharte, A., Portuondo, D. L., & Carlos, I. Z. Prophylactic and therapeutic vaccines against sporotrichosis. Feasibility and prospects. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 10, p. 432-440, 2019.