

AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *S. BRASILIENSIS* EM ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA PARA DIAGNÓSTICO DE ESPOROTRICOSE FELINA

DÉBORA MATILDE DE ALMEIDA¹; LAURA DE VARGAS MAIOCCHI²; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA³; SÉRGIO JORGE⁴; MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – deby.almeida@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lauradevargasmaiocchi@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – sergiojorgevet@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – marciaonobre@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença zoonótica causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix spp.* O *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta do clado clínico, e os felinos são a espécie mais acometida por essa micose (GREMIÃO et al., 2020). Os animais se contaminam com o fungo inserido em habitat natural, pelo costume de arranhar cascas de árvore e contato com matéria orgânica, ou através de arranhadura e mordedura em agressões intraespécie (RAMÍREZ-SOTO et al., 2018). O diagnóstico definitivo é estabelecido através do isolamento e caracterização do agente etiológico por meio de cultura micológica e conversão da forma filamentosa para leveduriforme (DE MIRANDA et al., 2018). No entanto, devido ao tempo para confirmar o dimorfismo do fungo e a necessidade de que o laboratório seja certificado como nível 2 de biossegurança para realizar o teste, o diagnóstico pode demorar (DE MIRANDA et al., 2018).

Visto as dificuldades encontradas na realização do diagnóstico convencional, outras alternativas estão sendo aplicadas, pelo uso de PCR ou testes sorológicos (FERNANDES et al., 2011). O uso do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto como ferramenta diagnóstica se baseia na possibilidade de um teste mais rápido comparado ao método padrão, com alta sensibilidade e especificidade (ALVARADO et al., 2015). A partir de um antígeno conhecido, o ELISA tem sido aplicado tanto no diagnóstico como no acompanhamento terapêutico de humanos (ALMEIDA-PAES et al., 2007). Em felinos, há apenas um estudo utilizando o *S. brasiliensis* na forma de exoantígeno (RODRIGUES et al., 2015).

O uso de fragmentos imunogênicos para desenvolvimento de proteínas recombinantes para diagnóstico de doenças zoonóticas já tem sido explorado na medicina veterinária (FERNANDES et al., 2022). Na esporotricose, isolados provenientes da superfície da célula fúngica, bem como extraídos da parede celular já foram identificados, revelando sua importância na resposta imune do hospedeiro (PORTUONDO et al., 2019). Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um teste diagnóstico para esporotricose felina por meio de ELISA indireto, utilizando uma proteína recombinante de *S. brasiliensis* como antígeno.

2. METODOLOGIA

Foram selecionadas 24 amostras de soro de felinos com esporotricose, diagnosticados a partir da apresentação de sinais clínicos compatíveis com a

doença, isolamento e caracterização morfológica e conversão dimórfica do fungo. Acerca da coleta destas amostras, os felinos foram previamente classificados quanto ao sexo (8 fêmeas e 16 machos), e se eram acometidos por retrovíruses, como o vírus da leucemia felina - FelV (n = 3; 12,5%) e/ou da imunodeficiência felina – FIV (n = 7; 29,6%).

Como controle, foram selecionados 15 soros de felinos saudáveis, sem sinais clínicos de qualquer doença e negativos para retrovíruses. Além disso, foram utilizadas oito amostras de soros de felinos acometidos por outras doenças infecciosas, sendo FelV (n = 7) e FIV (n = 1), previamente diagnosticados por meio de imunocromatografia. Todas as amostras de soro dos animais utilizadas neste estudo foram obtidas de um banco de soros de projetos finalizados previamente aprovados pela Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Veterinária, da UFPEL (30742/2018) (24343019.9.0000.5317).

A proteína nomeada rChiGp70_Eno foi construída a partir das sequências codificadoras da proteína Gp70 e epítomos da Enolase de *S. brasiliensis* 5110 (DE ALMEIDA et al., 2018; PORTUONDO et al., 2019). A sequência de aminoácidos da proteína foi submetida à modelagem estrutural e analisada por softwares de bioinformática, e o gene foi sintetizado e fornecido em forma de vetor. A clonagem, expressão, purificação, bem como a avaliação do potencial antigênico da proteína recombinante será descrita em outro resumo neste congresso.

Para a realização do ELISA, placas de microtitulação de poliestireno (Nunc Polysorp, Nalge Nunc International, Rochester, NY, EUA) com 96 poços foram sensibilizadas em triplicatas com 200 ng da proteína rChiGp70_Eno por cavidade diluída em tampão Carbonato Bicarbonato 50 mM (pH 9,8) e incubada a 4 °C *overnight*. Após o período as placas foram lavadas três vezes com 200 µl por poço de PBS-T e bloqueadas com 200 µl de solução bloqueio (leite em pó desnatado) a 5% em PBS-T por 2 h a 37 °C. Depois de serem lavadas quatro vezes com PBS-T, as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C com soros de gatos diagnosticados com esporotricose na diluição 1:50 em leite desnatado a 2,5% em PBS-T. As placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T e foi adicionado conjugado de peroxidase IgG anti-felino (Sigma-Aldrich) e diluído a 1:5000 em PBS-T e incubadas por 1 h a 37 °C. Por fim, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e a reação foi revelada pela adição de uma solução contendo 0,004 g de o-fenilenodiamina dicloridrato em 10 ml de tampão citrato fosfato (pH 4,0) e 15 µl e H₂O₂ 30% por 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 3% por poço e a absorbância foi avaliada por meio de um leitor de microplacas de ELISA (Agilent BioTek 800 TS Absorbance Reader, Santa Clara, CA, USA) a 492 nm. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

A análise estatística foi realizada a partir do processamento dos dados no software GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, USA). Como medidas de análise foram verificados ponto de corte, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). O ponto de corte foi definido como a média aritmética mais 2 desvios padrão dos soros dos gatos saudáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise das 47 amostras sorológicas e pelo ponto de corte estabelecido em 0,020, 24 amostras foram classificadas como verdadeiramente positivas. No entanto, cinco amostras foram classificadas como falso positivas,

sendo duas do grupo de felinos saudáveis e três do grupo de felinos acometidos por retrovíroses, conforme observado na tabela 1.

Tabela 1 – Tabela 2x2 para os resultados obtidos do ELISA em comparação com o correto desfecho dos animais positivos ou não para esporotricose felina.

| | | Esporotricose | | Total |
|-------|----------|---------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | |
| ELISA | Positivo | 24 | 5 | 29 |
| | Negativo | 0 | 18 | 18 |
| Total | | 24 | 23 | 47 |

Desta forma, a performance do ensaio foi de 100% (IC 95%: 86%-100%) de sensibilidade e de 78,2% (IC 95%: 56%-93%) de especificidade. Em estudo similar avaliando o uso de exoantígeno de *S. schenckii* para a detecção sorológica de gatos acometidos por esporotricose, os resultados obtidos foram de 90% de sensibilidade, sendo inferior ao resultado encontrado neste estudo. Já a especificidade foi superior, sendo de 96% (FERNANDES et al., 2011). Já em humanos, o uso de exoantígeno obtido a partir de uma cepa de *S. brasiliensis* alcançou 87% de sensibilidade e 100% de especificidade (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2022). Na opinião do autor que já trabalhou com ambas as formas, a proteína recombinante permite uma melhor padronização do ELISA do que o exoantígeno bruto, principalmente se o laboratório onde foi desenvolvido o teste possuir mais recursos biotecnológicos.

O teste ainda performou com 100% de valor preditivo negativo e 82,7% de valor preditivo positivo. Valores semelhantes foram encontrados por ALVARADO et al. (2015), neste caso 86% de valor preditivo positivo e 100% de valor preditivo negativo, avaliando o uso de exoantígeno de *S. schenckii* no diagnóstico por ELISA em humanos.

Nosso estudo apresenta algumas limitações, principalmente pela quantidade de amostras analisadas, seja de gatos doentes ou não. Por mais que o número seja condizente com outros achados na literatura, o baixo número de amostras pode impactar significativamente na sensibilidade e especificidade do teste. Ainda mais, devido à baixa casuística de animais acometidos na região de Pelotas/RS não foi possível a inclusão de soros heterólogos no desenvolvimento deste ELISA. Desta forma, a avaliação da possibilidade de reações cruzadas com doenças fúngicas como criptococose e histoplasmose foi prejudicada.

4. CONCLUSÕES

Apesar das limitações, nossas evidências sugerem que o uso da proteína recombinante de *S. brasiliensis* como antígeno teve aplicação eficaz no desenvolvimento do ELISA para diagnóstico de esporotricose felina, também performando com alta sensibilidade e boa especificidade na detecção das amostras sorológicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 3, p. 244–249, mar. 2007.
- ALVARADO, P. et al. Diagnóstico serológico de la esporotricosis mediante el empleo del antígeno de micelio de *Sporothrix schenckii* sensu stricto. **Invest. clín.**, p. 111–122, 2015.
- BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. Anti-*Sporothrix* Antibody Detection in Domestic Cats as an Indicator of a Possible New Occurrence Area for Sporotrichosis in North Brazil. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 375–384, 1 ago. 2022.
- DE ALMEIDA, J. R. F. et al. An immunoproteomic approach revealing peptides from *Sporothrix brasiliensis* that induce a cellular immune response in subcutaneous sporotrichosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4192, 8 mar. 2018.
- DE MIRANDA, L. H. M. et al. Monitoring Fungal Burden and Viability of *Sporothrix* spp. in Skin Lesions of Cats for Predicting Antifungal Treatment Response. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 92, set. 2018.
- 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, n. 3, p. 445–449, 27 jan. 2011.
- FERNANDES, L. G. V. et al. A New Recombinant Multiepitope Chimeric Protein of *Leptospira interrogans* Is a Promising Marker for the Serodiagnosis of Leptospirosis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 11, p. 362, nov. 2022.
- GREMIÃO, I. D. F. et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 107–124, 1 mar. 2020.
- PORTUONDO, D. L. et al. Immunization with recombinant enolase of *Sporothrix* spp. (rSsEno) confers effective protection against sporotrichosis in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17179, 20 nov. 2019.
- RAMÍREZ-SOTO, M. C. et al. Ecological Determinants of Sporotrichosis Etiological Agents. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 95, set. 2018.
- RODRIGUES, A. M. et al. Proteomics-Based Characterization of the Humoral Immune Response in Sporotrichosis: Toward Discovery of Potential Diagnostic and Vaccine Antigens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. e0004016, 25 ago. 2015.