

## AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE CEPAS DE *SPOROTHRIX BRASILIENSIS* ISOLADOS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

ATHENA CRISTINA DE AZAMBUJA RODRIGUES<sup>1</sup>; TATIÉLEN HERNANDEZ SEVERO<sup>2</sup>; DÉBORA MATILDE DE ALMEIDA<sup>2</sup>; SIMONE ZARICHTA RAKULOSKI<sup>2</sup>; SÉRGIO JORGE<sup>2</sup>; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE<sup>3</sup>.

1 Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)- Laboratório ClinPet – [athenacris@gmail.com](mailto:athenacris@gmail.com)

2 UFPEL- Favet- Laboratório ClinPet – [tatihsevero@gmail.com](mailto:tatihsevero@gmail.com)

2 UFPEL- Favet- Laboratório ClinPet – [almeida.debora.m@gmail.com](mailto:almeida.debora.m@gmail.com)

2 UFPEL- Laboratório ClinPet- [simonezrakuloski@gmail.com](mailto:simonezrakuloski@gmail.com)

2 UFPEL- Favet- Laboratório ClinPet – [sergiojorgevet@hotmail.com](mailto:sergiojorgevet@hotmail.com)

3 UFPEL – IB- Laboratório de Micologia e Bioprospecção – [pattsn@gmail.com](mailto:pattsn@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença fúngica subaguda ou crônica causada por implantação traumática do fungo dimórfico saprófito *Sporothrix* spp. (CRUZ, 2013). A doença pode acometer o homem e as mais diversas espécies, sendo principalmente encontrado em gatos, onde apresenta principal relevância nos casos de zoonoses (PIRES, 2017). Esta doença tem sido relatada nas regiões sul e sudeste há quase 21 anos (LOPES-BEZERRA et al., 2018), sendo que o *Sporothrix brasiliensis* foi identificado em 2007 (MARIMOM et al., 2007). Este patógeno emergente está associado a uma doença sistêmica em gatos, é altamente virulento, apresenta resistência à azóis e também está relacionado a casos clínicos graves em humanos, incluindo hospitalizações (LACERDA FILHO et al., 2019; SILVA-VERGARA et al., 2012). Atualmente, por meio de uma análise do genoma de *S. brasiliensis*, foi levantada a hipótese de que esta espécie emergente é evolutivamente mais adaptada ao parasitismo de mamíferos em comparação com *S. schenckii* (TEIXEIRA et al., 2014).

A transmissão dos felinos para humano e de gato para gato geralmente ocorre por meio de mordidas ou arranhões de animais doentes (PAES et al., 2011). Frequentemente, os gatos tem acesso as regiões ao redor da sua residência e com seu envolvimento em brigas, principalmente felinos machos e não castrados, ligado ao seu hábito de arrancar troncos de árvores, entre outros fatores comportamentais, podem facilitar a dispersão de *Sporothrix* spp. no ambiente (BARROS et al., 2004).

Atualmente, as técnicas sorológicas são ferramentas importantes de diagnóstico e para monitorar a resposta ao tratamento ou recidivas da esporotricose. Anteriormente, testes de ELISA baseados em um antígeno purificado de *Sporothrix* spp. e exoantígenos mostraram alta sensibilidade quando avaliados com soros de gatos com esporotricose confirmada de áreas endêmicas (FERNANDES et al., 2010).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar os antígenos de *S. brasiliensis*, obtidos no RS e em MG, com maior potencial para utilização em diagnóstico indireto de esporotricose em felinos.

## 2. METODOLOGIA

Para a produção dos extratos brutos das leveduras, foram repicados três cepas do gênero *S. brasiliensis* em placas de ágar Sabouraud, incubadas na estufa por sete dias a 37°C. As cepas utilizadas foram LM20, cedida pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), cepa MG10 a qual foi cedida pelo Labiomic da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a cepa CP01 da micoteca do Laboratório ClinPet da UFPEL. Após o crescimento e obtenção das leveduras, as colônias foram escarificadas em 3 ml de solução salina a 0,9% e adicionado 0,01 ml de tween, sendo diluído em solução salina e a leitura realizada no espectrofotômetro em 80-82% de transmitância.

Após obtenção dos inóculos, os mesmos foram acrescidos em 100 ml de caldo BHI com antibiótico, e incubados no Shaker por um período de sete dias, a 37°C e 180 rpm. Transcorrido o período de incubação, o material passou por centrifugação a 3.600 rpm por um período de 30 minutos e resfriada a 6°C, sendo extraído o pellet e lavado três vezes em água Milli-Q. Na sequência, foi realizada a extração de exoantígenos proteicos brutos de levedura, sendo o pellet final congelado com adição gradual de nitrogênio líquido e triturado por um pilão até a obtenção de um pó fino. Após, foram misturadas com 4 ml de tampão Tris-Ca<sup>2+</sup> (Tris-HCl 20 mM pH 8,8, CaCl<sub>2</sub> 2 mM); e então foram adicionadas 0,1ml de esferas de vidro (Sigma 425-600 mm) e a mistura foi agitada em vortex por 30 min a 4°C. Os detritos celulares e as esferas de vidro foram removidos após a centrifugação (10.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos). Posteriormente, foi separado o sobrenadante e adicionado 40 µl de Ditiotretol (20 mM) e as amostras foram congeladas para posterior uso (RODRIGUES et al., 2014). Os exoantígenos extraídos foram concentrados através da utilização de uma membrana de diálise e adicionado açúcar como agente osmótico. As proteínas dos extratos concentrados foram caracterizados através das técnicas de *Western Blot* e SDS-Page no qual foram adicionados os três isolados de *Sporothrix* spp.

Para o ELISA indireto, foram utilizados oito soros de felinos positivos para a esporotricose felina e oito soros de gatos hígidos. O teste foi realizado em duplicata. Uma placa de 96 cavidades foi sensibilizada com 100µl de cada extrato bruto dos diferentes isolados e incubado overnight à 4°C. Posteriormente, foram realizadas três lavagens seriadas com PBS-T 1X e logo após bloqueada com 200µl de leite desnatado a 5% diluído em PBS-T e incubado a 37°C por 2h. Imediatamente, realizaram-se uma nova sessão de lavagens com PBS-T e adicionado 100µl de soro dos felinos e incubado por 1 hora a 37°C. Na sequência, foi adicionado 100µl do anticorpo secundário anti-cat IgG conjugado com peroxidase (Sigma®) incubado por 1 hora a 37°C e, posteriormente, realizado cinco vezes a lavagem. A revelação foi realizada pela adição de uma solução contendo 0,004g o-fenilenodiamina dicloridrato em 10ml de tampão citrato fosfato (pH 4,0) e 15µl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por 15 minutos, à temperatura ambiente, em local escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.

A análise estatística do estudo foi realizada pelo método de análise de variância (ANOVA), sendo o nível de significância admitido de p<0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na técnica de *Western Blot* foram observadas bandas do tamanho esperado compatíveis com as proteínas recombinantes e bandas dos antígenos brutos, confirmando a antigenicidade dos mesmos (Figura 1-A).

Após a realização do teste ELISA, notamos no presente trabalho que apesar de haver diferença de absorvância entre os isolados de felinos positivos e negativos para a esporotricose felina, não observa-se diferença estatística de acordo com a análise de variância (ANOVA) em diferentes cepas, conforme demonstra a Figura 1-B. Com isso, apesar dos estudos genéticos e biomoleculares demonstrarem que as cepas encontradas no Brasil apresentam uma variação genômica (TEIXEIRA, et al., 2014), notou-se que a reatividade dos anticorpos IgG dos isolados supracitados não apresentaram diferença, podendo indicar que as cepas de *Sporothrix* spp. avaliadas são antigenicamente similares.

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, essa baixa diversidade antigênica identificada entre cepas isoladas nos estados de RS e MG sugerem que estes antígenos podem ser avaliados para uso em ensaios vacinais bem como a utilização em diagnóstico indireto para a esporotricose felina em todo o país.

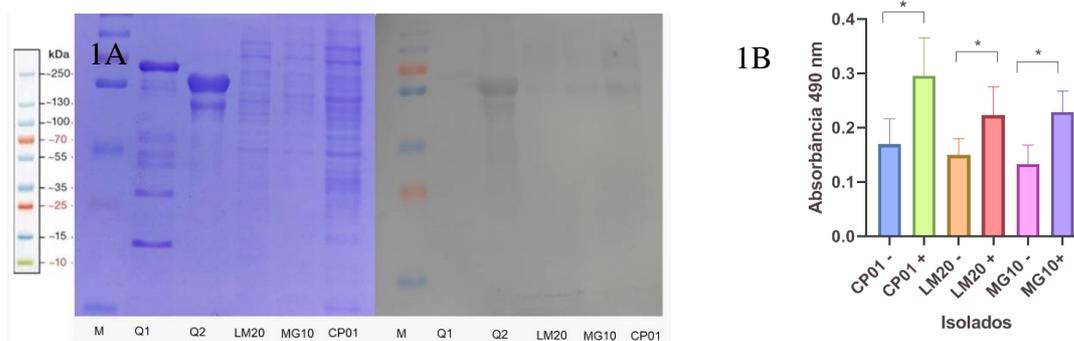


Figura 1-A: SDS-Page e *Western Blot* demonstrando a caracterização das diferentes bandas e proteínas; Figura 2-B: Resultado da absorvância dos soros de felinos infectados frente aos isolados no RS e MG.

### 4. CONCLUSÕES

Nesse estudo, foi identificado que não há variação antigênica de *S. brasiliensis* entre os isolados no Rio Grande do Sul e Minas Gerais quando avaliados utilizando os soros de felinos naturalmente infectados. Com isso, mais estudos são necessários utilizando outras cepas de *Sporothrix* spp., a fim de identificar um alvo antigênico capaz de ser utilizado em um ensaio de diagnóstico indireto sensível e específico para a esporotricose felina.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS M.B.L, SCHUBACH A.O, do VALLE A.C, GALHARDO M.C.G, CONCEIÇÃO-SILVA F, SCHUBACH T.M, REIS R.S, WANKE B, MARZOCH K.B, et al. Epidemia de esporotricose transmitida por gatos no Rio de Janeiro, Brasil: descrição de uma série de casos. *Clin Infect Dis*. V. 38, p.529–535, 2004.

CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.8–28, 2013.

FERNANDES G.F, LOPES-BEZERRA L.M, BERNARDES-ENGEMANN A.R, SCHUBACH T.M.P, DIAS M.A.G.D, PEREIRA S.A, CAMARGO Z.P. Sorodiagnóstico de infecção por esporotricose em gatos por ensaio imunoenzimático usando um antígeno específico, SsCBF, e exoantígenos brutos. **Vet Microbiol**. V.147 p.445–449, 2010.

LACERDA FILHO A.M, CAVALCANTE C.M, DA SILVA A.B, INÁCIO C.P, de LIMA-NETO R.G, de ANDRADE M.C.L, MAGALHÃES O.M.C, Dos SANTOS F.A.G, NEVES R.P. Esporotricose ocular transmitida por gatos de alta virulência. **Micopatologia**. V. 184 p. 547–549, 2019.

LOPES-BEZERRA L.M, MORA-MONTES H.M, ZHANG Y, NINO-VEGA G, RODRIGUES A.M, de CAMARGO Z.P, de HOOG S. Esporotricose entre 1898 e 2017: A evolução do conhecimento sobre uma doença mutável e sobre agentes etiológicos emergentes. **Med Mycol**. V. 56 p.126–143, 2018.

MARIMON R, CANO J, GENÉ J, SUTTON DA, KAWASAKI M, GUARRO J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*, três novas espécies de *Sporothrix* de interesse clínico. **J Clin Microbiol**. V.45 p.3198–3206, 2007.

PAES R.A, SCHUBACH A.O, BARROS M.B.L. *Sporothrix schenckii* e esporotricose. **Clin Microbiol** 24 p. 633–654, 2011.

PIRES, C. Revisão de literatura: esporotricose felina. **Revista de Educação Continuada Em Medicina Veterinária e Zootecnia Do CRMV-SP**, v. 15, n.1, p.16–23, 2017.

RODRIGUES A.M, KUBITSCHK- BARREIRA P.H, FERNANDES G.F, de ALMEIDA S.R, LOPES-BEZERRA L.M, de CAMARGO Z.P. Two-dimensional gel electrophoresis data for proteomic profiling of *Sporothrix* yeast cells. **Elsevier**. V.2, p.32-38, 2015.

SILVA-VERGARA M.L, de CAMARGO Z.P, SILVA P.F, ABDALLA M.R, SGARBIERI R.N, RODRIGUES A.M, dos SANTOS K.C, BARATA C.H, FERREIRA-PAIM K. Infecção disseminada por *Sporothrix brasiliensis* com envolvimento endocárdico e ocular em um paciente infectado pelo HIV. **Am J Trop Med Hyg**. v. 86 p.477–480, 2012.

TEIXEIRA M.M, de ALMEIDA L.G, KUBITSCHK- BARREIRA P, ALVES F.L, KIOSHIMA E.S, ABADIO A.K, FERNANDES L, DERENGOWSKI L.S, FERREIRA K.S, et al. Genômica comparativa dos principais agentes fúngicos da esporotricose humana e animal: *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis*. **BMC Genomics**. V. 15 p. 943, 2014.