

## UTILIZAÇÃO DE *DOT BLOTTING* EM DIAGNÓSTICO DE ESPOROTRICOSE FELINA

TATIÉLEN HERNANDEZ SEVERO<sup>1</sup>; ATHENA CRISTINA DE AZAMBUJA RODRIGUES<sup>2</sup>; DÉBORA MATILDE DE ALMEIDA<sup>3</sup>; SIMONE ZARICHTA RAKULOSKI<sup>4</sup>; SÉRGIO JORGE<sup>5</sup>; RODRIGO CASQUEIRO CUNHA<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – [tatihsevero@gmail.com](mailto:tatihsevero@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – [athenacris@gmail.com](mailto:athenacris@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – [almeidadeboram@gmail.com](mailto:almeidadeboram@gmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – [simonezrakuloski@gmaol.com](mailto:simonezrakuloski@gmaol.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – [sergio.jorge@ufpel.edu.br](mailto:sergio.jorge@ufpel.edu.br)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório de Biologia Molecular – [rodrigocunha\\_vet@hotmail.com](mailto:rodrigocunha_vet@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenki*, que abrange sete subespécies de importância médica e veterinária *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. luriei* e *S. chilensis* (Makrl et al. 2020). *Sporothrix brasiliensis* é considerado a espécie mais patogênica (Orofino-Costa et al. 2017) e é o principal agente etiológico causador da esporotricose animal no Brasil (Rodrigues et al. 2013).

O fungo pode apresentar-se como hifas saprófitas no solo, plantas e madeira em decomposição e como conídios na forma leveduriforme (Rodrigues et al. 2013). Assim, o comportamento dos gatos domésticos os torna mais suscetível ao contágio por *Sporothrix* spp., principalmente por estarem em proximidade com o solo e restos de plantas (Schubach, 2004). Do mesmo modo os comportamentos de caça, briga e de socialização dos gatos que têm acesso ao ambiente peridomiciliar, faz com que estejam mais suscetíveis (Pereira et al. 2015), visto que, muitas vezes, entram em contato com animais infectados cujas lesões contêm alta carga fúngica (Macêdo-Sales et al. 2018).

Além de desempenharem um importante papel na transmissão deste fungo, os gatos são considerados sinalizadores, aos quais o agente se adaptou com alta patogenicidade. Entender a dinâmica da resposta imune dos felinos frente a *Sporothrix* spp. proporciona aos profissionais, clínicos e cientistas, uma melhor compreensão sobre a relação entre o fungo e o hospedeiro. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar através de ensaio de Dot-blotting a detecção de uma cepa local de *S. brasiliensis* pelos anticorpos IgG presentes no soro de felinos infectados naturalmente.

### 2. METODOLOGIA

Para a realização da pesquisa foi utilizada uma cepa cedida gentilmente pelo Laboratório de Micologia- LabMico, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), proveniente de um isolado clínico de um felino infectado naturalmente no município de Pelotas, RS. Este isolado foi caracterizado como sendo pertencente ao gênero *Sporothrix* por macro e microscopia, e como sendo *S. brasiliensis*, por PCR.

No laboratório ClinPet, a cepa foi repicada em ágar *Sabouraud* e incubada em estufa bacteriológica regulada a 37 °C, durante sete dias. Transferida para caldo

*brain heart infusion* (BHI) onde permaneceu em incubadora com agitação orbital a 180 rpm, a 37 °C por sete dias. Após, o cultivo foi centrifugado a 6.000 g a 6 °C por 20 minutos em tubos de fundo cônico de 50 mL para sedimentação das células, sendo o sobrenadante descartado. Por três vezes, o sedimento foi lavado com água ultrapura tipo 1 (Mili Q) e centrifugado novamente.

A extração do antígeno a partir do sedimento celular foi realizada adaptando-se um protocolo já descrito por Rodrigues et al. (2005). O *pellet* final rendeu um volume de aproximadamente 3 mL, foi congelado em nitrogênio líquido e macerado em grau e pistilo por quatro vezes. Foram adicionados, ao produto da maceração, 4mL de tampão Tris-Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> (Tris-HCl 20 mM pH 8,8, CaCl<sub>2</sub> 2 mM), em seguida a mistura foi transferida para microtubos contendo esferas de vidro 600 µm (Sigma-Aldrich, MO, USA). As alíquotas foram submetidas a vórtex a 4 °C por 30 minutos, após foram centrifugadas em microcentrífuga a 10.000 g, a 4 °C por 10 minutos, sendo os sobrenadantes transferidos e os *pellets* contendo detritos celulares e esferas de vidro descartados.

A caracterização do extrato bruto foi realizada através da técnica de *Dot Blotting*, em que foram aplicados 10 µL de cada amostra na membrana de nitrocelulose (GVS Filter Technology, Sanford, USA) Foi utilizada uma proteína recombinante como controle positivo, já descrita como antigênica (de ALMEIDA et al. 2023), albumina como controle negativo e o extrato para análise. A membrana permaneceu em estufa durante 30 minutos a 37 °C, para secagem. Após, todas etapas foram realizadas deixando a membrana imersa, em agitação lenta e temperatura ambiente. A membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado 5% diluído em PBST 0,05%, por 50 minutos. Lavada quatro vezes com PBST. Posteriormente, foi adicionado soro de um felino infectado naturalmente por *Sporothrix* spp. na diluição de 1:500 em PBS 1x, por uma hora. Após a lavagem da membrana por três vezes foi adicionado anti-IgG de gato conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, MO, USA), na diluição de 1:5000 em PBST, durante 40 minutos. Lavada três vezes com PBST e adicionado à solução revelação (6 mg DAB+ 9 mL de TRIS HCl 50 mM pH 7,6 + 1 mL de sulfato de níquel 0,3% + 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por cinco minutos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realização do teste foi utilizado o extrato juntamente com duas amostras de soro de felinos com diagnóstico positivo cedidas pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCVet) da UFPEL. Para o diagnóstico desses pacientes foi realizada cultura micológica, que é considerado padrão-ouro para diagnóstico deste fungo (BARROS et al. 2011), sendo realizado no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária- MICVET/UFPEL,

Na técnica de *Dot blotting*, foram utilizados dois soros de felinos positivos para a esporotricose. Quando expostos à proteína recombinante, os soros reconheceram ligando-se ela, de modo que na etapa de revelação ocorreu uma reação imunocromatográfica, resultando em uma coloração acinzentada no local em que a proteína foi adsorvida na membrana. O extrato bruto de *S. brasiliensis* apresentou uma ligação com o soro dos felinos infectados, mais elevada quando comparada a proteína recombinante em um dos soros. Enquanto que o controle negativo não foi reconhecido por ambos os soros, como esperado, validando o teste, conforme a Figura 1.

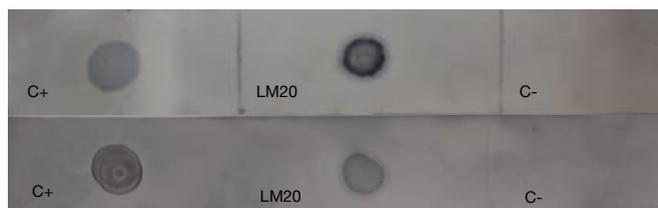


Figura 1- *Dot blot* utilizando extrato bruto de um isolado local (LM20) como antígeno confrontado com soros de felinos infectados. C+: controle positivo e C-: albumina como controle negativo

Esse resultado possibilitou observar a capacidade do exoantígeno de ser reconhecido pelos anticorpos específicos IgG presentes no soro de dois felinos domésticos com infecção ativa de esporotricose. Esta resposta promissora validou o teste e viabilizou a continuação deste estudo. A ausência de uma resposta imune eficiente do hospedeiro é um fator chave na progressão da doença (SCHUBACH et al. 2004), de modo que precisam ser realizados estudos continuados para entendermos melhor a capacidade do sistema imune em reconhecer o agente causador.

O *Dot blot* é uma técnica já descrita a décadas para diagnóstico de algumas doenças (PAPAS et al. 1985), não necessita de equipamentos específicos, sendo simples, rápida, de baixo custo e fácil realização. Em outras patologias esta já foi descrita por apresentar boa sensibilidade no início da infecção, sendo uma possível alternativa para o diagnóstico precoce (BLANCO, 2021), toda via são necessários mais estudos para padronização do uso diagnóstico de esporotricose animal.

Outra possibilidade é o uso da técnica para testes investigativos visando compreender melhor o sistema imune humoral frente a doença, podendo relacionar os resultados com diversos fatores. Assim, analisar os anticorpos IgG contra o *S. brasiliensis* em pacientes com diferentes estadiamentos clínicos e graus de lesões, possibilitando interpretar a reação antígeno relacionada ao estado clínico geral.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nesse estudo o extrato bruto extraído de um isolado local de *S. brasiliensis* no município de Pelotas/RS, demonstrou a capacidade de ser reconhecido pelo soro de felinos infectado naturalmente pela doença através da técnica de *Dot blotting*. Permitindo o uso de extratos brutos em mais estudos visando o desenvolvimento de novos ensaios de diagnósticos laboratoriais bem como uma melhor compreensão da relação entre antígeno e hospedeiro.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, M.B.L.; PAES, R.A.; SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin Microbiol Rev.** V. 4, p. 24633-54, 2011.

BLANCO, ROBERTA MOROZETTI. **Padronização e avaliação do Teste de *Dot-blot* IgM para o sorodiagnóstico da leptospirose humana.** 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DE ALMEIDA, D.M.; MAIOCCHI, L.V.; DE OLIVEIRA, N.R.; JORGE, S.; NOBRE, M.O. Avaliação de proteína recombinante de *S. brasiliensis* em ensaio de

imunoadsorção enzimática para diagnóstico de esporotricose felina. In: **XXV ENPÓS UFPEL**, Pelotas, 2023.

MACÊDO-SALES, P. A. et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. **BMC Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 19, dez. 2018.

MAKRI, N.; PATERSON, G. K.; GREGGE, F.; URQUHART, C.; NUTTALL, T. First case report of cutaneous sporotrichosis (*Sporothrix species*) in a cat in the UK. **JFMS Open Reports**, v.6, n.1, p.20551169-2090600, 2020.

OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P.M.; RODRIGUES, A.M.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R. **Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.

PAPPAS, M.G.; BALLOU, W.R.; GRAY, M.R.; TAKAFUJI, E.T.; MILER, R.N.; HOCKMEYER, W.T. Rapid serodiagnosis using the IgM-specific Dot-ELISA: comparasion with the microscopic agglutination test. **Am J Trop Med Hyg**. 34 (2): 346-54, 1985.

PEREIRA, S.A.; GREMIAO, I. D. F.; MENEZES, R. C. Sporotrichosis in animals: zoonotic transmission. **Sporotrichosis: new developments and future prospects**, p. 83-102, 2015.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERANDES, G. F.; BEZERRA, L.M.L.; FELIPE, M.S.; CAMARGO, Z.P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl Trop Dis**, São Paulo, v. 7, n. 6, p. 2281, 2013.

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, 2015.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B. L.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; PEREZ, M. A., WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**., Rio de Janeiro, v. 224, n. 10, p. 1623–1629, 2004.