

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RODRIGO DE ALMEIDA PAES

Antígenos e Anticorpos na Esporotricose: Caracterização e Aplicações Diagnósticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira

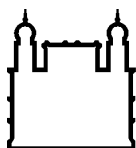
RIO DE JANEIRO

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: RODRIGO DE ALMEIDA PAES

Antígenos e Anticorpos na Esporotricose: Caracterização e Aplicações Diagnósticas

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Rosely Maria Zancopé Oliveira

Aprovada em: 03/08/2007

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dr^ª. Alda Maria da Cruz

Prof^ª. Dr^ª. Leila Maria Lopes Bezerra

Prof^ª. Dr^ª. Maria José Soares Mendes Giannini

RIO DE JANEIRO

2007

Aos meus pais, Gerson e Deolinda, por todo o esforço ao longo desses anos de minha existência, na minha criação e educação, razão única da existência desse trabalho no dia de hoje.

Agradecimentos

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pela oportunidade fornecida aos alunos de um curso de pós graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos professores do curso de Mestrado Acadêmico em Biologia Celular e Molecular, pelas aulas e conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

À Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela orientação dedicada a mim neste trabalho e pela oportunidade de realização de parte deste trabalho no exterior.

Ao Dr. Joshua D. Nosanchuk, pelo acolhimento em seu laboratório, pelo apoio financeiro durante minha estada no Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University e pela importantíssima ajuda na interpretação de dados e delineamento de experimentos. – *To Dr. Joshua D. Nosanchuk, for receive me in his lab, for the financial support during my stay at Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University and for the very important help on data analysis and experiment design. Thank you.*

Ao Dr. Paulo Cezar Fialho Monteiro, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses oito anos e meio de convívio, por acreditar no meu potencial na área de Micologia e pela ajuda com os termos médicos desta dissertação.

A Monique Amorim Pimenta, pela grande amizade e por toda a ajuda técnica no preparo do antígeno utilizado neste trabalho e na padronização da técnica de ELISA.

Ao Dr. Michael Winters, pela realização da espectrometria de massas e interpretação dos resultados. *To Dr. Michael Winters, for the mass spec experiments and interpretation of results. Thank you.*

Aos amigos do Serviço de Micologia, setor de Diagnóstico Micológico: Rosani, Maria Helena, Fábio e Mônica, pela ajuda na manutenção do isolado de *S. schenckii* utilizado e pelos agradáveis momentos de convívio.

Aos amigos do Serviço de Micologia, setor de Imunodiagnóstico: Mauro, Claudia, Patrícia, Priscila, Karla, Allan, Thiago e André, pela ajuda durante a realização dos testes de ELISA e pelos agradáveis momentos de convívio.

Aos amigos do Albert Einstein College of Medicine: Susana, Attila, Li, Luis, David, Antonio, Johanna, Marcella e Magdia, pela ajuda com os meus experimentos e pelos agradáveis momentos de convívio – *To my friends at Albert Einstein College of Medicine: Susana, Attila, Li, Luis, David, Antonio, Johanna, Marcella and Magdia, for the help during my experiments and for the pleasant moments together. Thank you.*

Aos Drs. Armando de Oliveira Schubach e Maria Clara Gutierrez Galhardo, pelo fornecimento das informações clínicas dos pacientes incluídos neste estudo.

Ao Prof. Dr. José Mauro Peralta, pela revisão e valiosas sugestões no texto desta dissertação.

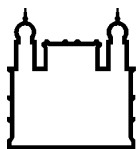
À Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio financeiro concedido.

Ao Fogarty International Center, pelo apoio financeiro fornecido pelo Interhemispheric Research Training Grant in Infectious Diseases.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Antígenos e anticorpos na esporotricose: caracterização e aplicações diagnósticas

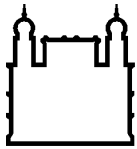
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rodrigo de Almeida Paes

A esporotricose é uma importante micose subcutânea que apresenta aumento do número de casos em todo o mundo. Entretanto, poucos são os dados disponíveis sobre seus aspectos imunológicos, em especial da resposta humoral e como consequência há uma falta de imunoenaios padronizados. Neste trabalho um ensaio imunoenzimático foi desenvolvido para detecção de anticorpos específicos em amostras de soro de 90 pacientes com diferentes formas clínicas de esporotricose. Reações cruzadas foram analisadas com 72 soros heterólogos de pacientes com histoplasmose, paracoccidiodomicose, criptococose, aspergilose, tuberculose e leishmaniose tegumentar americana. O teste foi feito com exoantígenos da forma filamentosa de *Sporothrix schenckii*, um complexo antigênico que apresenta duas proteínas com homologia à proteína STB2 de *Saccharomyces cerevisiae*, como determinado por espectrometria de massas. Verificou-se uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 89% neste ensaio. Reações cruzadas foram observadas, da mesma forma como em outros imunoenaios para o diagnóstico da esporotricose. O ELISA demonstra ser especialmente útil nas formas cutâneas da doença, que não são facilmente diagnosticadas com as técnicas de aglutinação e precipitação disponíveis. Utilizando este protocolo padronizado também verificamos imunoglobulina G, IgM e IgA no soro de 41 pacientes com esporotricose antes da terapia antifúngica e em outros 35 pacientes com esporotricose durante o tratamento com itraconazol. Anticorpos IgA contra exoantígenos de *S. schenckii* foram presentes na maioria dos pacientes antes do tratamento (95,1%), assim como IgM e IgG (85,4%). IgG apresentou maior frequência em pacientes em tratamento (91,4%). Percentagens de amostras positivas para IgM (71,4%) e IgA (88,6%) foram menores em pacientes em tratamento, assim como a média de densidade ótica. Setenta e oito por cento dos pacientes com esporotricose sem tratamento tiveram níveis detectáveis de todos os isotipos testados e essa porcentagem caiu para 62,9% em pacientes recebendo itraconazol. Porcentagem de pacientes com pelo menos dois isotipos detectáveis foi 92,7% antes do tratamento e 88,6% depois, mostrando que a detecção destes três isotipos juntos aumenta a sensibilidade do sorodiagnóstico da esporotricose. Reatividade de 94 soros de pacientes com outras doenças e indivíduos saudáveis foi testada e reações cruzadas foram vistas, em especial com IgM nos pacientes com leishmaniose. De forma geral, 8,5% dos soros heterólogos foram positivos em pelo menos dois isotipos e somente um (1,1%) foi positivo nos três isotipos. Esses resultados sugerem que o ELISA usando exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* é uma ferramenta sensível no sorodiagnóstico da esporotricose e pode ser utilizado em conjunção com métodos convencionais de diagnóstico desta infecção.

Palavras-chave: Antígenos, Anticorpos, ELISA, Esporotricose



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ**Antigens and antibodies in sporotrichosis: characterization and application
on diagnosis****ABSTRACT****DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****Rodrigo de Almeida Paes**

Sporotrichosis is an important subcutaneous mycosis, with increasing numbers of cases all over the world. However, only few data is available regarding its immunological aspects, particularly the humoral response. Consequently, there is a lack of standardized immunoassays. In this work an enzyme-linked immunosorbent assay was developed for specific antibody detection in serum samples obtained from 90 patients with different clinical forms of sporotrichosis. Potential cross-reactions were analyzed with 72 heterologous sera from patients with histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, cryptococcosis, aspergillosis, tuberculosis and American tegumentary leishmaniasis. The assay was developed with mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens, an antigenic complex presenting two proteins with homology to STB2 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, as analyzed by mass spectrometry. We found a sensitivity of 97% and a specificity of 89% in this assay. Some cross reactions were seen, as observed in other immunoassays for the diagnosis of sporotrichosis. The ELISA appears to be especially useful for cutaneous forms of disease, since they are not promptly diagnosed with available immunoprecipitation or agglutination techniques. Using this standardized protocol we also measured immunoglobulin G, IgM and IgA in sera from 41 patients with sporotrichosis before antifungal treatment and from another 35 patients with sporotrichosis during itraconazole treatment course. IgA antibodies against *S. schenckii* exoantigens were present in the majority of patients before treatment (95.1%), as well as IgM and IgG (85.4%). IgG presented higher frequency in patients under treatment (91.4%). Percentages of positive samples for IgM (71.4%) and IgA (88.6%) were lower in patients under treatment and differences in mean optical densities were significant. Seventy-eight percent of sporotrichosis patients without treatment had detectable levels of all isotypes tested and this percentage dropped to 62.9% in patients receiving itraconazole. Percentage of patients with at least two detectable isotypes was 92.7% before treatment and 88.6% after, showing that detection of these three isotypes together improves sensitivity in the serodiagnosis of sporotrichosis. Reactivity of 94 sera from patients with other diseases and healthy individuals was also tested and some cross reactivity was seen, especially with IgM in leishmaniasis patients. In general, 8.5% of these heterologous sera were positive for at least two isotypes and only one (1.1%) was positive for the three isotypes. These results suggest that the ELISA using mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens is a very sensitive tool for the serodiagnosis of sporotrichosis and can be used in conjunction with conventional methods of diagnosis for this infection.

Key-words: Antigens, Antibodies, ELISA, Sporotrichosis

Lista de abreviaturas

ABD – ágar batata dextrose

APS – persulfato de amônio

BHI – infusão de cérebro e coração

CD – cluster of differentiation

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – desvio padrão

ELISA – ensaio imunoenzimático

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IFN – interferon

Ig - imunoglobulina

IL – interleucina

IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

MALDI – ionização / dessorção de matriz assistida por laser

MS – espectrometria de massas

NADPH – nicotinamida adenine dinucleotídio fostafo (forma reduzida)

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

ROC – receiver operating characteristics

SDS – dodecil sulfato de sódio

TBS – salina tamponada com Tris

TBS - T – salina tamponada com Tris adicionada com tween

TBS - TL – salina tamponada com Tris adicionada com tween e leite desnatado

TEMED - N, N, N', N' tetrametil etilenodiamina

TG-ROC – two graph receiver operating characteristics

TNF – fator de necrose tumoral

TOF – tempo de vôo

Índice

INTRODUÇÃO	1
Histórico	1
O patógeno	1
Patogenia da esporotricose humana	2
Patogenia da esporotricose em animais domésticos	4
Resposta imune na esporotricose	6
Prováveis fatores de virulência.....	7
Epidemiologia	11
Situação da esporotricose no Rio de Janeiro	12
Diagnóstico laboratorial da esporotricose	13
OBJETIVOS.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS	17
Amostra fúngica	17
Amostragem de soros humanos.....	17
Produção do antígeno	19
SDS-PAGE.....	19
Imunoblot	21
ELISA	22
Cálculo de pontos de corte	24
Espectrometria de massas.....	25
Identificação das proteínas	26
Análise de antigenicidade.....	26
Análise estatística	26
RESULTADOS	28
Características morfológicas do isolado utilizado.....	28
Análise do extrato antigênico	29
Padronização da técnica de ELISA	30
Reatividade sorológica no ensaio	30
Curva ROC e parâmetros do teste.....	32
Comparação da resposta entre as diferentes formas clínicas da esporotricose	33
Reações cruzadas	33
Reprodutibilidade do ensaio.....	34

	xi
Resposta imune humoral na esporotricose	35
Curvas TG-ROC e determinação do ponto de corte	35
Detecção de anticorpos nos soros de pacientes com esporotricose	35
Perfil de anticorpos em pacientes sob terapia antifúngica	38
Reações cruzadas	40
Comparação entre detecção de diferentes isotipos de anticorpos.....	41
Aplicabilidade da detecção de diferentes isotipos no sorodiagnóstico da esporotricose	42
Caracterização de proteínas antigênicas.....	43
DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO 1.....	70
ANEXO 2.....	77

Introdução

Histórico

O fungo *Sporothrix schenckii* foi isolado pela primeira vez pelo estudante de medicina Benjamin Schenck, em 1896, de um paciente com 36 anos, do sexo masculino, apresentando lesões na mão e no braço direito. Este isolado, obtido da secreção dos abscessos que o paciente apresentava, foi estudado pelo micologista Erwin Smith, que concluiu que este fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum* (Schenck, 1898). Anteriormente, Linck em 1809 e Lutz em 1889 já tinham se referido a possíveis casos de esporotricose. No entanto, não foi possível o isolamento do fungo para a confirmação dos casos (apud Kwon-Chung & Bennet, 1992). O segundo caso indiscutível de esporotricose descrito, também nos Estados Unidos, em Chicago, por Hekton & Perkins em 1900, relata o desenvolvimento de uma lesão no dedo de um menino após ter sido ferido com martelo, lesão esta que regrediu espontaneamente. Tais pesquisadores deram a esse fungo patogênico sua denominação atual, *Sporothrix schenckii* (Hekton & Perkins, 1900).

Em 1907, o primeiro caso de infecção natural em animais foi descrito por Lutz e Splendore, em ratos, no Brasil (Lutz & Splendore, 1907). Este fungo tem sido identificado em diversas áreas do mundo e, nos anos mais recentes, a maioria dos casos publicados são provenientes da América Central e do Sul, em especial México, Colômbia, Brasil e Peru, além do continente africano (Pappas *et al.*, 2000).

O patógeno

O fungo dimórfico *S. schenckii* é o agente etiológico da esporotricose, uma micose subcutânea adquirida por inoculação traumática do fungo nos tecidos. Eventualmente, a inalação dos conídios do fungo pode levar a uma infecção primária pulmonar e posterior disseminação, tal como nas micoses sistêmicas (Rippon, 1988). Esse microrganismo faz parte do Reino *Fungi*, é organismo eucariótico, heterotrófico, sem mobilidade própria, apresentando parede celular rígida e quitinosa. Pertence à Divisão *Ascomycota* e à classe *Pyrenomycetes*, ordem *Ophiostomatales*, e família *Ophiostomataceae* (Guarro *et al.*, 1999).

Até o presente 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). Estudos demonstram que *S. schenckii* é um ascomiceto,

uma vez que apresenta septo simples, com corpúsculos de Woronin (Smith & Batenburg-van der Vegte, 1985) e três genes de quitina sintase (Chua *et al.*, 1994). Análises moleculares da região 18S do DNA ribossomal mostraram evidências indiretas de que a forma sexuada deste fungo pudesse ser *Ophiostoma stenoceras* (Berbee & Taylor, 1992) porém, estudos morfo-fisiológicos mostram diferenças básicas entre as duas espécies: *O. stenoceras* é incapaz de produzir conídios demáceos, ao contrário de *S. schenckii*, e este não produz peritécio em meios de batata, arroz ou malte, como acontece com os isolados de *O. stenoceras* (Dixon *et al.*, 1991; O'Reilly & Altman, 2006); as diferenças também se demonstram quando ambas espécies são inoculadas em camundongos, pois *S. schenckii* é encontrado em diversos tecidos após inoculação intravenosa, o que não ocorre com *O. stenoceras*, que somente é encontrado em determinados órgãos e nunca em todos os animais inoculados (Dixon *et al.*, 1992). Tais observações levaram a considerar como espécies diferentes o anamorfo de *O. stenoceras* (*Sporothrix* sp.) e *S. schenckii*. Outros estudos moleculares (Hintz, 1999) unidos aos de Berbee & Taylor (1992), reforçam, entretanto, que a forma teleomórfica do patógeno *S. schenckii* pertença ao gênero *Ophiostoma*.

O habitat natural de *S. schenckii* pode ser vegetação, madeira em decomposição ou não e solo. *Sporothrix schenckii* é um fungo dimórfico. Em vida saprofítica ou em cultivo a 25°C se apresenta na forma filamentosa, com hifas hialinas, septadas e ramificadas, com conídios unicelulares de dois tipos: hialinos a marrom, pequenos, ovóides, surgindo de denticulos distintos na porção apical de conidióforos, e conídios demáceos grandes, ovóides, de parede celular grossa, sendo observados ao longo de toda a extensão das hifas (St-Germain & Summerbell, 1996). Os conídios nunca originam outros conídios ou formam cadeias (Sigler *et al.*, 1990). Em parasitismo ou quando cultivados a 37°C, *S. schenckii* se apresenta como levedura unicelular ovalada, globosa e em forma de charuto, podendo apresentar um ou mais brotamentos (Chandler *et al.*, 1980).

Patogenia da esporotricose humana

Geralmente a infecção por *S. schenckii* segue-se após inoculação do fungo na pele, por ocasião de um trauma com espinhos, farpas, arranhadura, mordedura ou ainda através da contaminação de solução de continuidade cutânea pré-existente (Jin *et al.*, 1990; Marques *et al.*, 1993), alcançando os tecidos cutâneo e subcutâneo, limitando-se aquém dos linfonodos regionais. Indivíduos que trabalham com solo ou plantas, tais como lavradores, jardineiros, agricultores, entre outros, são os mais suscetíveis ao contato com este agente infectante, desenvolvendo essa micose com maior frequência. Habitualmente, os sítios de infecção são os membros inferiores e superiores (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

O aspecto clínico da esporotricose é muito variado, observando-se as seguintes formas clínicas: cutânea fixa, linfocutânea, cutânea disseminada e extracutânea (Morris-Jones, 2002). Estas diferentes formas clínicas da esporotricose estão relacionadas a fatores de virulência do isolado infectante, à rota de infecção e a fatores imunológicos do hospedeiro (Kong *et al.*, 2006).

O primeiro sinal da doença linfocutânea é o aparecimento de um nódulo subcutâneo pequeno, duro, móvel, não aderido; podendo evoluir em múltiplos nódulos subcutâneos ao longo dos canais linfáticos locais, que podem supurar, ulcerar e drenar pus. A forma cutânea fixa se difere desta por não alcançar o canal linfático local, permanecendo como uma lesão única (Rippon, 1988). A forma cutânea disseminada é rara e se manifesta como lesões múltiplas em diversas partes do corpo, podendo atingir também ossos e articulações. Provavelmente o fungo dissemina-se pelo organismo por via hematogênica (Morris-Jones, 2002). A forma pulmonar primária (forma extracutânea) é muito rara e ocorre após inalação de conídios. Clinicamente é muito parecida com a tuberculose, onde a área apical do pulmão parece ser o sítio de infecção mais freqüente (Rippon, 1988). Já foram descritos casos de disseminação hematogênica desta micose, atingindo ossos, articulações, pele, olhos, sistema nervoso central, ou trato genito-urinário. A disseminação hematogênica do fungo é possível porque *S. schenckii* é capaz de interagir com células endoteliais *in vitro* e atravessá-las (Figueiredo *et al.*, 2004). A forma extracutânea não decorre exclusivamente da forma pulmonar primária, mas também pode evoluir de uma lesão cutânea (Kwon-Chung & Bennet, 1992). As formas disseminada e extracutânea ocorrem mais freqüentemente em indivíduos imunocomprometidos, tais como, alcoólatras, diabéticos, pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, sarcoidose, leucemia, transplantados de órgão ou medula óssea, indivíduos sob corticoterapia e pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (Al-Tawfiq & Wools, 1998; Yelverton *et al.*, 2006) e provavelmente em pacientes com defeito metabólico na função da NADPH oxidase, como ocorre por exemplo na doença granulomatosa crônica (Kajiwara *et al.*, 2004).

Recentemente, Gutierrez-Galhardo e colaboradores reportaram o aparecimento de eritema nodoso em pacientes com esporotricose. Tal patologia está provavelmente relacionada a mecanismos de hipersensibilidade e, até então, dentre as infecções fúngicas, somente a histoplasmose e a coccidioidomicose haviam sido descritas acompanhadas de eritema nodoso (Gutierrez-Galhardo *et al.*, 2002). O mesmo grupo também relata eritema multiforme na esporotricose como uma manifestação incomum desta doença (Gutierrez-Galhardo *et al.*, 2005).

Embora sejam relatados casos de regressão espontânea da esporotricose (Rippon, 1988; Barros *et al.*, 2003), o tratamento é necessário para a grande maioria dos pacientes (Kusuhara, *et al.*, 1988; Davis, 1996). Dentre os medicamentos disponíveis, o mais utilizado durante muitas décadas foi o iodeto de potássio (Kauffman, 1995), o qual não deve ter ação direta sobre o fungo, mas deve atuar aumentando as defesas do organismo contra o patógeno. Entretanto, há sérias complicações na administração deste medicamento, em especial alergias e problemas mais graves, como edema pulmonar, angioedema, mialgia, linfadenopatia, urticária, vasculite, psoríase pustular, acidose metabólica e iododerma, entre outros. Seu uso é desaconselhável em mulheres grávidas e pessoas com comprometimento de rim e tireóide (Sterling & Heymann, 2000). Portanto, nos países desenvolvidos (Kauffman, 1995; Morris-Jones, 2002) e mais recentemente no Brasil (Barros *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2004), tem se utilizado o itraconazol no tratamento de pacientes com esporotricose, com uma boa evolução para cura das lesões nestes pacientes. Entretanto, estudos de susceptibilidade a antimicrobianos *in vitro* demonstram que isolados de pacientes com forma disseminada da infecção apresentam uma menor susceptibilidade ao itraconazol, o que provavelmente contribui para a falha terapêutica com esta droga nos pacientes com esta forma mais grave de esporotricose (Trilles *et al.*, 2005). Uma alternativa ao itraconazol em pacientes com manifestações mais graves da esporotricose é o tratamento com anfotericina B (Kohler *et al.*, 2007), entretanto casos de esporotricose refratários ao tratamento com anfotericina B já foram relatados (Baker *et al.*, 1989). Esses fatores levam a uma busca por novas estratégias terapêuticas na esporotricose.

Patogenia da esporotricose em animais domésticos

Até o presente, a patogenia da esporotricose em animais tem sido pouco descrita. Têm sido relatadas em alguns animais lesões ulceradas, exsudativas, de bordos irregulares que podem tomar grandes proporções e em alguns casos disseminar (Marques *et al.*, 1993). Recentemente descreveu-se o aparecimento de formas severas de estomatite e dermatite em cobras infectadas por *S. schenckii* em um lago da Flórida (Cheatwood *et al.*, 2003). A forma disseminada da esporotricose em animais foi descrita pela primeira vez em 1979, onde a lesão inicial em um gato consistia de uma ulceração piogranulomatosa; na necropsia o fungo foi encontrado em linfonodo axilar, pulmões e fígado (Rippon, 1988). Também tem sido relatado o comprometimento do baço e dos ossos, além dos órgãos discriminados acima, sendo fator determinante de óbitos (Marques *et al.*, 1993). A forma disseminada ocorre principalmente em gatos por disseminação hematogênica do fungo (Schubach *et al.*, 2003a; Schubach *et al.*, 2004a), tendo como resultado o acometimento de diversos órgãos do felino, tais como pele, pulmão, fígado, baço, linfonodos, coração e rim (Schubach *et al.*, 2003b).

Os felinos são muito susceptíveis à infecção por *S. schenckii*. Os sítios de infecção mais freqüentes são os membros, nariz e orelha. Os hábitos higiênicos dos felinos, entre os quais podemos citar o ato de lambar-se e o de enterrar fezes, seu instinto de caça, brigas na disputa da fêmea, e seu hábito de perambular em áreas fora do perímetro domiciliar os expõem a algumas infecções e os permite infectar outros animais, inclusive o homem (Schubach & Schubach, 2000). Os felinos domésticos podem, ainda, estar colonizados por *S. schenckii*, não apresentando doença em atividade, o que favoreceria a transmissão zoonótica desta infecção (Schubach *et al.*, 2001a).

A associação entre criptococose, uma micose causada pela levedura *Cryptococcus neoformans*, e imunodeficiência felina tem sido descrita na literatura. Em função dessa deficiência, os gatos desenvolvem a forma sistêmica da criptococose (García & Blanco, 2000). O aumento nos casos de esporotricose sistêmica em felinos tem sido observado nos últimos anos, e sugere-se que quadro semelhante ao ocorrido na criptococose poderia ser desenvolvido também na esporotricose. Entretanto, até o presente momento, não foi verificada associação de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e esporotricose (Schubach *et al.*, 2004b). A exuberância de células fúngicas nas lesões de esporotricose, as quais podem ser observadas até mesmo no exame direto a fresco, é característica em gatos domésticos infectados. Isto poderia facilitar a transmissão intra e interespecífica desta micose (Reed *et al.*, 1993). A transmissão da esporotricose de gatos para humanos também é favorecida pela presença do fungo nas unhas dos felinos infectados, o qual é inoculado no tecido subcutâneo do indivíduo no momento da arranhadura (Schubach *et al.*, 2001b).

A esporotricose em cães em geral é uma doença auto-limitada e responde bem ao tratamento (Whittemore & Webb, 2007). Em geral os animais apresentam anemia, leucocitose com neutrofilia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia como sinais inespecíficos mais comuns. Sintomas respiratórios são as manifestações mais freqüentes na infecção extracutânea e a maioria das lesões localiza-se em geral no focinho dos animais (Schubach *et al.*, 2006). Esta infecção pode ser confundida com leishmaniose, seja por sinais clínicos como por reações cruzadas em testes imunológicos, sendo importante o diagnóstico diferencial entre as duas infecções (Santos *et al.*, 2007).

A estreita relação entre seres humanos e animais de estimação pode ser apontada como uma das responsáveis pela transmissão de doenças infecciosas como é o caso da dermatofitose, verminoses, toxoplasmose, leishmaniose, raiva entre outras, em que o animal constitui um reservatório do agente infeccioso em questão, sendo algumas vezes assintomático (Martinko, 2000). A transmissão de esporotricose de animais infectados para seus donos ou tratadores tem sido descrita na literatura (Marques *et al.*, 1993, Oliveira-Neto *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2004)

não só com diagnóstico clínico, mas também com isolamento do fungo. Essa transmissão foi confirmada em um caso de esporotricose através de estudos moleculares utilizando digestão do DNA dos isolados de *S. schenckii* do animal e do paciente com enzimas de restrição (Reed *et al.*, 1993) e recentemente em 14 surtos domiciliares envolvendo animais e seres humanos ocorridos no Estado do Rio de Janeiro através da técnica da reação da polimerase em cadeia utilizando iniciadores randômicos (Reis, 2004). No Rio de Janeiro, apresentações clínicas pouco comuns vêm sendo relacionadas à transmissão zoonótica da esporotricose (Schubach *et al.*, 2003).

Resposta imune na esporotricose

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e no controle de infecções causadas por *S. schenckii* ainda não estão muito bem compreendidos, porém, devem incluir tanto a resposta imune humoral como a celular (Carlos *et al.*, 1992; Maia *et al.*, 2006), as quais parecem ser disparadas contra antígenos distintos. Os antígenos de superfície, em especial certo tipo de lipídeos, inibem o processo de fagocitose, enquanto que a resposta humoral é ativada por proteínas secretadas pelo fungo, ou exoantígenos, os quais não têm qualquer ação na resposta celular (Carlos *et al.*, 2003).

A imunidade adquirida contra o fungo requer a ação de macrófagos ativados por linfócitos T CD4+, os quais liberam principalmente IFN- γ , forte ativador de macrófagos (Tachibana *et al.*, 1999). O TNF- α , uma citocina que atua sobre macrófagos ativados para produzirem reativos de nitrogênio, em especial óxido nítrico (Carlos *et al.*, 2003), o qual apresenta alto grau citotóxico contra o fungo (Fernandes *et al.*, 2000) é produzido nos momentos iniciais da infecção, bem como no seu término, para sua resolução total (Maia *et al.*, 2006). Monócitos e macrófagos quando fagocitam conídios e células leveduriformes de *S. schenckii* são fortemente induzidos a produzir reativos de oxigênio (Romero-Martinez *et al.*, 2000). Estes reativos, em especial o ânion superóxido e seus metabólitos oxidativamente reativos, que também são produzidos por neutrófilos, estão envolvidos em respostas fungistáticas e fungicidas, sendo que sua ausência está relacionada a uma maior letalidade em infecção experimental em camundongos (Kajiwara *et al.*, 2004). O TNF- α tem sua produção severamente diminuída no início da infecção o que levaria o fungo a conseguir se multiplicar e infectar os tecidos hospedeiros. O inverso ocorre após dois meses de infecção, onde os níveis de IL-1 e TNF- α , citocinas importantes na resposta inflamatória (Janeway *et al.*, 2000) são aumentados, favorecendo a eliminação do fungo (Carlos *et al.*, 1994). Assim sendo, a resposta Th1 é de fundamental importância na patogênese da esporotricose e sua ativação diferencial é responsável por manifestações clínicas variadas (Uenotsuchi *et al.*, 2006). A ativação de

células Th1 tem sido relatada como responsável por diferentes formas clínicas em outras doenças infecciosas cutâneas, como por exemplo, a leishmaniose (Carvalho *et al.*, 2007).

O sistema complemento também pode ser ativado por *S. schenckii*, em especial a via alternada, embora não se possa descartar a ativação da via clássica do complemento durante a infecção. A ativação do sistema complemento favoreceria a fagocitose das células leveduriformes do fungo, pela deposição do componente C3b do complemento em sua parede, bem como a formação do complexo de ataque à membrana favoreceria a lise das células do fungo (Torinuki & Tagami, 1985; Scott *et al.*, 1986).

Alguns estudos têm sido realizados sobre a estrutura antigênica de isolados de *S. schenckii*. Recentemente foi demonstrado que extratos de cultura da forma filamentosa do fungo apresentam, de acordo com o meio de cultivo utilizado, variações na composição protéica e na reatividade imunológica frente a soros homólogos e heterólogos, sendo o meio de Sabouraud o mais adequado para a obtenção de um bom extrato antigênico. Entretanto, somente um isolado de *S. schenckii* foi utilizado neste estudo e os autores alertam para a necessidade de se estudar a composição antigênica de mais isolados desse fungo e também de se estudar os componentes antigênicos de sua forma leveduriforme (Mendoza *et al.*, 2002). Três glicoproteínas da parede celular de *S. schenckii*, que se ligam à concanavalina A e de pesos moleculares de 84, 70 e 58 kDa apresentam reatividade na técnica de imunoblot com soros homólogos (Lima & Lopes-Bezerra, 1997).

Quanto à resposta imune humoral ao patógeno *S. schenckii*, já foram caracterizados determinantes antigênicos de peptido-ramnomanas em coelhos. Entretanto estes não apresentam reações cruzadas contra manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, mas fracas reações cruzadas contra glicopeptídeos da parede celular de *O. stenoceras* foram verificadas (Lopes-Alves *et al.*, 1994). Também foi descrito que na esporotricose experimental em camundongos, anticorpos específicos da classe IgG1 e IgG3 contra uma proteína de 70 kDa são produzidos no decorrer da infecção e podem estar relacionados à eliminação do fungo do organismo desses animais (Nascimento & Almeida, 2005). Novos estudos são necessários no sentido de melhor caracterizar a resposta imune humoral na esporotricose, visto que vários aspectos continuam obscuros, como por exemplo, quais isotipos de imunoglobulinas estão envolvidos nas respostas aos diferentes antígenos do fungo.

Prováveis fatores de virulência

Fator de virulência pode ser definido como algum fator que o microrganismo possua que aumente sua patogenicidade no hospedeiro. Para estudar um fator de virulência é necessária uma comparação da interação com o hospedeiro entre um isolado que expresse o

fator e outro isolado mutante que não seja capaz de expressá-lo, o que pode ser conseguido tanto por mutagênese induzida, como por estratégias moleculares. Havendo diferenças na patogenicidade das infecções causadas pelos isolados, deve-se fazer com que o isolado mutante recupere a propriedade de expressar o fator de virulência e verificar após isso se ele consegue instalar a infecção com uma patogenicidade maior (Hogan *et al.*, 1996).

A origem da virulência microbiana tem sido alvo de diversos trabalhos. Em geral, a teoria mais aceita é a de que através da interação microbiana no solo os microrganismos patogênicos adquirem estratégias de sobrevivência que levam a uma maior virulência quando encontram um hospedeiro animal. Esses microrganismos possuem habilidades de, no hospedeiro mamífero, por exemplo, formar biofilmes, adquirir ferro e produzir enzimas proteolíticas que vão levar a uma elevada virulência (Casadevall, 2006).

Nesta linha de pensamento, Steenbergen e colaboradores, sugerem que a origem da virulência em *S. schenckii* esteja relacionada às relações inter microbianas existentes em seu habitat natural. Os autores demonstraram que células leveduriformes de *S. schenckii* quando fagocitadas por *Acantamoeba castellanii*, uma ameba de solo, são capazes de sobreviver em seu interior, matar a ameba e utilizá-la como nutriente. Esta característica não é compartilhada por fungos patogênicos que não tenham o solo como seu habitat primário, como *Candida albicans*, por exemplo, ou por fungos não patogênicos, como *S. cerevisiae*, mas compartilhada por outros fungos dimórficos patogênicos, como *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (Steenbergen *et al.*, 2004) e por *C. neoformans*, uma levedura com elevada patogenicidade (Malliaris *et al.*, 2004).

Muito pouco é conhecido sobre os fatores de virulência de *S. schenckii*, devido à escassez de estudos. Entretanto, alguns candidatos têm emergido de recentes investigações.

Um dos fatores de virulência apresentados por *S. schenckii*, assim como por outros fungos patogênicos, é a sua termotolerância. De fato, isolados capazes de crescer a 35°C, mas incapazes de fazê-lo a 37°C não são capazes de causar linfangites, limitando-se a infecções cutâneas fixas. Já os isolados de lesões linfangíticas, disseminadas e extracutâneas apresentam tolerância e crescimento a temperatura de 37°C (Kwon-Chung & Bennet, 1992). Resultados de um recente estudo mostram que isolados de *S. schenckii* provenientes da Colômbia, onde a forma clínica predominante da esporotricose é a cutânea fixa, apresentam alta taxa de inibição do crescimento a 35 e a 37°C, ao contrário de cepas do México e da Guatemala, onde predominam as formas linfangíticas (Mesa-Arango *et al.*, 2002). Em um ensaio *in vivo* com camundongos, foi demonstrado que o aquecimento das patas de camundongos BALB/c utilizando uma gaiola com aquecimento no chão diminui a magnitude da proliferação do fungo isolado de lesão cutânea, em comparação com os camundongos controle, mantidos em gaiolas

sem aquecimento. Já os isolados de lesão pulmonar conseguem proliferar normalmente (Tachibana *et al.*, 1998).

O fungo *S. schenckii* também apresenta a capacidade de sintetizar melanina. Este composto está altamente relacionado à virulência de diversos fungos (Jacobson, 2000). A produção de melanina nos conídios de *S. schenckii* ocorre através da via do 1,8 – diidroxínaftaleno penta acetato (Romero-Martinez *et al.*, 2000). Embora macroscopicamente somente a forma filamentosa do fungo pareça ser melanizada, recentemente foi demonstrada a produção de melanina por *S. schenckii* também nas formas leveduriformes, tanto *in vitro* como durante a infecção. As hifas, porém, não são capazes de sintetizar melanina, somente os conídios (Morris-Jones *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a melanização dos conídios torna-os mais resistentes à fagocitose por macrófagos, o que favoreceria a instalação da infecção, já que estas são as partículas infectantes do fungo (Romero-Martinez *et al.*, 2000). Corroborando com esta hipótese, foi demonstrado através de tipagem molecular de cepa de *S. schenckii* isolada de lesão de um laboratorista após manipulação de duas amostras de *S. schenckii*, uma com pigmentação escura e outra sem pigmentação. Verificou-se o mesmo padrão genotípico entre o isolado infectante e a amostra dematiácea manipulada (Cooper *et al.*, 1992a).

Sendo *S. schenckii* um fungo que vive na natureza e que não precisa, obrigatoriamente parasitar um organismo para completar seu ciclo de vida, a melanização dos conídios também deve ser importante contra pressões ambientais, já que a forma filamentosa é aquela encontrada na natureza (Morris-Jones *et al.*, 2003). Algumas evidências sobre a melanização do *S. schenckii in vivo* já tinham sido descritas anteriormente, tal como a formação de um fraco halo marrom na parede celular das células leveduriformes de *S. schenckii* quando tecidos infectados eram corados pelo Fontana-Masson, uma coloração utilizada para demonstrar a produção de melanina em *C. neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 1981). Atualmente esta hipótese foi confirmada, tanto pela produção de “fantasmas” de melanina direto nos tecidos de animais infectados, bem como pela detecção de anticorpos anti-melanina nos soros de pacientes com esporotricose (Morris-Jones *et al.*, 2003). Assim como a melanização em *C. neoformans* e em *H. capsulatum* diminui suas suscetibilidades à anfotericina B e à caspofungina (van Duin *et al.*, 2002), a formação de pigmentos de melanina por *S. schenckii* pode contribuir para dificultar o tratamento de alguns casos de esporotricose, em especial os casos de doença extracutânea ou em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Morris-Jones *et al.*, 2003).

A adesão primária às células endoteliais e epiteliais, assim como aos componentes da matrix extracelular são essenciais para uma eficaz invasão dos tecidos por patógenos. Tanto células leveduriformes como conídios de *S. schenckii* são capazes de reconhecer três

importantes glicoproteínas da matrix extracelular: fibronectina, laminina e colágeno do tipo II (Lima *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que o fungo apresenta integrinas ou adesinas lectina-like que reconhecem a fibronectina humana em diversos pontos desta molécula (Lima *et al.*, 2001), sendo estes receptores para fibronectina distintos dos receptores para laminina (Lima *et al.*, 2004). Sabe-se também que estes receptores estão presentes tanto nas hifas como nas células leveduriformes do fungo, embora as leveduras de *S. schenckii* possuam uma maior capacidade de ligação à matrix extracelular. A presença destas adesinas facilitaria a aderência a tecidos do hospedeiro e sua disseminação pelo organismo (Lima *et al.*, 2004). A expressão destas moléculas neste fungo provavelmente estão ligadas à virulência, já que sua expressão preferencial se dá na forma parasitária do fungo e não em sua forma saprofítica.

Também foi recentemente demonstrada a interação *in vitro* de *S. schenckii* com células endoteliais humanas, as quais podem internalizar as formas leveduriformes do fungo sem serem lesadas ou terem sua viabilidade diminuída. Além disso, o fungo também consegue atravessar o espaço intercelular. Ambos os processos poderiam facilitar a entrada do fungo na corrente sanguínea e sua conseqüente disseminação hematogênica (Figueiredo *et al.*, 2004). Embora tenha-se demonstrado as proteínas endoteliais responsáveis por essa interação, as proteínas fúngicas necessárias para o reconhecimento e adesão não foram identificadas, e o papel delas como fatores de virulência ainda precisa ser esclarecido.

O papel de diferentes proteínas na virulência de diversos fungos já está bem caracterizado. O antígeno imunodominante de *Paracoccidioides brasiliensis*, uma glicoproteína de peso molecular de 43kDa, é a molécula responsável pelo reconhecimento e ligação à laminina e à fibronectina, o que aumenta a patogenia do fungo (Vicentini *et al.*, 1994, Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Proteínas ligantes de cálcio são importantes na virulência de *H. capsulatum* já que permitem a aquisição deste íon em microambientes com limitações nutricionais de Ca^{2+} (Woods, 2003). Em *Aspergillus fumigatus*, uma série de proteínas relacionadas à virulência já está bem estudada, como diferentes adesinas importantes na adesão aos tecidos, uma hemolisina de 30 kDa, que causa lise de eritrócitos, diversas proteases que favorecem a colonização dos pulmões e a destruição de fatores humorais, uma catalase de 350 kDa, importante como antioxidante no processo de fagocitose, entre outras (Latgé, 1999). Entretanto, o papel das diferentes proteínas de *S. schenckii* na virulência deste fungo permanece obscuro. Acredita-se que fosfatases ácidas atuem na interação fungo-macrófago, embora não haja evidências claras quanto a isso (Hogan *et al.*, 1996). Peptido-ramnomanas da parede celular causam depressão da resposta imune até a sexta semana de infecção e podem servir como fator de virulência (Carlos *et al.*, 1998). Devido à escassez de informações, se faz

urgente caracterizar diferentes proteínas de *S. schenckii* e determinar novos fatores de virulência, para um maior entendimento da patogenia da esporotricose.

Epidemiologia

A esporotricose é a micose subcutânea mais prevalente na América Latina (Conti-Diaz, 1989), onde as taxas de infecção em áreas rurais podem alcançar um caso para cada 1000 indivíduos (Pappas *et al.*, 2000).

No homem, a esporotricose é uma doença que costuma ocorrer sob a forma de casos isolados ou pequenos surtos familiares ou profissionais, envolvendo pessoas expostas a vegetais ou solo rico em matéria orgânica, como agricultores, floristas, jardineiros e mineiros, além de laboratoristas (Carrada-Bravo, 1975; Cooper *et al.*, 1992a; Hajjeh *et al.*, 1997). Epidemias envolvendo grande número de pessoas ou amplas regiões geográficas são raras e têm sido relacionadas a uma fonte de infecção comum no ambiente, sendo a maior epidemia conhecida de esporotricose registrada na África do Sul, em trabalhadores de uma mina cujas madeiras estavam contaminadas pelo fungo (Quintal, 2000). Outra importante epidemia ocorreu nos Estados Unidos, sendo relacionada a um tipo de musgo contaminado por *S. schenckii* (Coles *et al.*, 1992), a qual foi confirmada por métodos moleculares de tipagem dos isolados clínicos e ambientais (Cooper *et al.*, 1992b). Também nos Estados Unidos, uma microepidemia de esporotricose ocorreu através da contaminação de pessoas pelo feno estocado numa casa abandonada, onde se realizavam festas de “Halloween” (Dooley *et al.*, 1997). Mais recentemente foi descrita na Austrália um aumento do número de casos de esporotricose, que por métodos moleculares ficou demonstrado ser relacionado à exposição ao fungo presente no feno (O’Reilly & Altman, 2006).

No Brasil, a esporotricose foi primeiramente reportada em 1907 (Lutz & Splendore, 1907). Desde então, outros casos têm sido descritos, em especial no Rio Grande do Sul e em São Paulo (Freitas *et al.*, 1965; Lopes *et al.*, 1999). Uma recente revisão dos casos de esporotricose no Rio Grande do Sul entre 1967 e 2002 revelou um número de 304 casos de esporotricose, sendo 96% deles confirmados pelo isolamento de *S. schenckii* em cultura. Na maioria dos pacientes (75%) a infecção foi relacionada a exposição à matéria orgânica contaminada. Não foi possível verificar transmissão zoonótica da esporotricose neste estudo. Também foi verificado que o número de casos de esporotricose nesse estado brasileiro está diminuindo desde a década de 90 (Rosa *et al.*, 2005). Em um inquérito epidemiológico com esporotriquina realizado em Morro Velho, uma cidade do quadrilátero ferrífero em Minas Gerais revelou positividade em 13,67% dos indivíduos submetidos ao estudo, embora *S. schenckii* não tenha sido isolado de nenhuma amostra de solo colhida no local do inquérito

(Rodrigues & Resende, 1996). Assim como no Sul do país, casos de esporotricose também foram evidenciados em um estudo realizado na região Norte, no período de 1973 a 1983 (Talhari *et al.*, 1988).

Situação da esporotricose no Rio de Janeiro

Sobre a casuística de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro, foi relatado por Barros e colaboradores (2004) que, no período de 1987 a 1998, apenas treze casos de esporotricose humana foram diagnosticados no IPEC. Desses, somente em dois pacientes a fonte de infecção desta micose foi associada à arranhadura por um gato doente. Entretanto, num período de 24 meses (julho de 1998 a julho de 2000), 66 casos de esporotricose humana, 117 de esporotricose felina e 7 de canina foram diagnosticados no mesmo centro, sendo 78,8% dos casos de esporotricose humana causados por contato ou arranhadura de gatos com esporotricose (Barros *et al.*, 2001). Outros 112 casos foram reportados até o final de 2001, verificando-se um número crescente de casos de esporotricose ocorrendo no Estado, em especial nos municípios do Rio de Janeiro, Duque de Caxias e São João de Meriti (Barros *et al.*, 2004). Estes dados sugerem a ocorrência de uma epidemia de esporotricose no referido Estado brasileiro (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). Esta difere das epidemias ocorridas em outros lugares do mundo por não serem transmitidas por uma fonte vegetal contaminada pelo fungo, mas sim por gatos domésticos infectados por *S. schenckii*.

Díficeis são as explicações para este aumento dramático do número de casos de esporotricose no Rio de Janeiro. Os pesquisadores que investigam este fato até o presente não chegaram a uma conclusão definitiva sobre o assunto (Schubach *et al.*, 2005a). Entretanto, tem sido observado que a maioria dos casos de esporotricose diagnosticados após 1998 ocorreram em áreas caracterizadas por condições sócio-econômicas não privilegiadas, com serviços precários de saúde e saneamento. A maioria dos pacientes é do sexo feminino, a maioria donas-de-casa, as quais acabam sendo mais expostas ao contágio do fungo através do cuidado com gatos infectados (Schubach *et al.*, 2005b). Barros e colaboradores explicam como fatores responsáveis por esta epidemia zoonótica de esporotricose o comportamento dos gatos domésticos, os quais, embora convivam com os humanos, têm hábitos de circular pela vizinhança, onde por várias vezes acabam entrando em contato com outros gatos e com solo e vegetação (Barros *et al.*, 2004).

Numa análise filogenética de 18 isolados de *S. schenckii* do Estado do Rio de Janeiro entre 1999 e 2003 foi possível observar a presença de seis diferentes genótipos, o que leva a concluir que esta epidemia é causada não por um genótipo único, altamente virulento, mas sim por um grande conjunto de diferentes genótipos. Estes genótipos, entretanto são

completamente diferenciáveis dos genótipos de *S. schenckii* de outros países, como Argentina, Espanha, África do Sul, Peru, Colômbia e Bolívia, o que pode explicar as diferenças clínicas e manifestações incomuns desta doença no Brasil (Marimon *et al.*, 2006).

Diagnóstico laboratorial da esporotricose

O diagnóstico definitivo da esporotricose é realizado pelo isolamento e identificação de seu agente etiológico em cultivo (Kwon-Chung & Bennett, 1992). As células leveduriformes presentes no material clínico são pequenas, escassas e de difícil observação no exame micológico direto (KOH a 10% ou NaOH a 4%), exceto quando o espécime biológico é proveniente de gatos domésticos (Reed *et al.*, 1993).

Esfregaços de pus e impressão de tecidos biopsiados de lesões corados pelo Giemsa aumentam a sensibilidade do exame, já que a visualização da forma infectante é favorecida. Para cortes histológicos costuma-se usar impregnação pela prata, ácido periódico de Schiff e hematoxilina & eosina, porém, a menos que o material esteja muito rico em células parasitárias, não é fácil a observação das formas leveduriformes características de *S. schenckii* (Morris-Jones, 2002). Geralmente, estas têm aspecto variando do globoso a ovalado com brotamentos claveiformes, no interior de macrófagos, e, em cerca de 40% dos casos onde o fungo é encontrado, nota-se a presença de corpo asteróide, substância eosinofílica de forma radiada constituída de complexo antígeno-anticorpo, que se deposita na parede de alguns fungos (Chandler *et al.*, 1980; Morris-Jones, 2002). Alguns autores enfatizam a importância da observação do corpo asteróide no diagnóstico da esporotricose, para que um tratamento específico possa ser iniciado em um intervalo menor de tempo (Civila *et al.*, 2004; Gezuele & Rosa, 2005).

O isolamento de *S. schenckii* é facilmente obtido através da semeadura do espécime clínico, que, em geral, é biópsia ou o pus da lesão, sem um tratamento prévio, em Ágar Sabouraud com cloranfenicol para evitar contaminação bacteriana, adicionado ou não de cicloheximida, droga que reduz a contaminação por alguns fungos saprófitas. Após cinco a sete dias de incubação a 25°C ou a temperatura ambiente já é possível observar o aparecimento de colônias filamentosas, hialinas com aspecto úmido que, com o tempo, ou começam a apresentar uma coloração escura no seu centro que vai aumentando centrifugamente ou permanecem hialinas. Observando-se o crescimento de uma colônia com esse aspecto faz-se o teste de termo-conversão do fungo em meio BHI ágar com extrato de levedura, distribuindo-se um pequeno inóculo por toda a superfície do meio de cultura e incubando a 37°C por cinco dias. A colônia, após a conversão do fungo à forma leveduriforme, assumirá um aspecto cremoso de cor bege amarelado (Morris-Jones, 2002).

As colônias de *S. schenckii* são urease negativas após sete dias, podendo tornar-se urease positivas ao décimo-quarto dia (Sigler *et al.*, 1990). Na fase filamentosa deve-se montar uma cultura em lâmina para um estudo mais detalhado da microscopia das estruturas fúngicas. A presença de dois tipos de conídios: hialinos a marrom, de parede fina, em conidióforo do tipo simpodial e conídios escuros de parede espessa, dispostos ao longo da hifa identifica o isolado como *S. schenckii* (Dixon *et al.*, 1991). Em cultura à 37°C, *S. schenckii* apresenta células leveduriformes hialinas, pequenas, globosas com um ou mais brotamentos claveiformes, tais como aquelas observadas no exame direto. A confecção de lâminas de *S. schenckii*, tanto na fase filamentosa como na leveduriforme, é feita com o corante lactofenol-azul de algodão e estas são observadas em um microscópio óptico nos aumentos de 100 e 400X.

O teste cutâneo (intradermorreação) com esporotriquina detecta reação de hipersensibilidade do tipo tardia, ou seja, a resposta imune celular, e pode ser uma ferramenta diagnóstica útil, principalmente em estudos epidemiológicos. Ela é usualmente positiva em mais de 90% dos casos comprovados de esporotricose, mas pode também indicar infecção prévia (Itoh *et al.*, 1986).

Para o estabelecimento do diagnóstico imunológico de detecção de anticorpo no soro de pacientes com esporotricose, várias técnicas têm sido descritas. Reações de imunodifusão dupla para soros de pacientes com esporotricose não costumam apresentar reações cruzadas com soros de pacientes com leishmaniose e cromoblastomicose, doenças com manifestações clínicas semelhantes às da esporotricose. O teste de imunoeletroforese também apresenta alta sensibilidade, sendo observado em todos os casos positivos a presença de um arco anódico, chamado arco S (Albornoz *et al.*, 1984). Os testes de aglutinação em tubo e em partículas de látex têm grande valor na pesquisa de anticorpos, demonstrando boa sensibilidade e especificidade (Karlín & Nielsen, 1970; Blumer *et al.*, 1973; Casserone *et al.*, 1983).

Técnicas imunológicas mais sensíveis começaram a ser padronizadas para sua utilização no sorodiagnóstico da esporotricose. Loureiro y Penha & Lopes-Bezerra descreveram a detecção de anticorpos contra uma peptido-ramnomanana capaz de se ligar à concanavalina-A da parede celular de *S. schenckii*. Empregando este antígeno em um teste no formato de ELISA foi demonstrado 100% de sensibilidade, quando testado frente a 35 soros de pacientes com esporotricose. Entretanto, soros de pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram um baixo grau de reatividade cruzada com esse antígeno (Loureiro y Penha & Lopes-Bezerra, 2000). Quando esse antígeno foi testado pelo imunoblot, sensibilidades que variaram de 91,3 a 65,2% foram encontradas, de acordo com o isolado utilizado para produzir o antígeno (Pereira *et al.*, 2003). A técnica de imunoblot utilizando proteínas de massa

molecular de 40 e 70 kDa oriundas de exoantígenos da fase leveduriforme do fungo apresentou 100 % de sensibilidade e 95% de especificidade (Scott & Muchmore, 1989). Mais recentemente, em uma tentativa de nosso grupo em reproduzir estes achados, foi observada uma sensibilidade de 100%, mas alta reatividade cruzada com soros de pacientes com paracoccidiodomicose foi verificada (Almeida-Paes *et al.*, 2002). Na amostragem de Scott & Muchmore (1989) soros de pacientes com esta micose não foram incluídos, provavelmente pelo fato de que não há casos de paracoccidiodomicose nos Estados Unidos da América. Esses resultados sugerem que técnicas imunológicas para detecção de anticorpos podem ser de grande valia para o diagnóstico da esporotricose. Entretanto, ainda é um desafio importante em termos de se obter um teste de alta especificidade, devido às diversas infecções fúngicas existentes, principalmente na população brasileira.

Recentemente, técnicas imunoenzimáticas começaram a ser utilizadas no diagnóstico da esporotricose. Duas reações de ELISA foram descritas: a primeira utilizando um antígeno purificado de parede celular da forma leveduriforme (Bernardes-Engemann *et al.*, 2005) e outra utilizando extrato bruto de cultivo da forma filamentosa de *S. schenckii* (Almeida-Paes *et al.*, 2007). Ambas técnicas apresentam valores satisfatórios de especificidade e sensibilidade.

Objetivos

Sabe-se que os antígenos que *S. schenckii* produz e secreta quando cultivado em sua forma filamentosa em diferentes meios de cultura, especialmente as moléculas de 90 e 50 kDa, aparentemente são antígenos espécie-específicos. A expressão ótima desses componentes antigênicos ocorre na fase estacionária de cultivo do fungo em meio líquido de Sabouraud (Mendoza *et al.*, 2002). Assim sendo, este trabalho teve como objetivo geral caracterizar preliminarmente o complexo antigênico, verificando sua aplicabilidade no sorodiagnóstico da esporotricose. Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Avaliar a aplicabilidade dos exoantígenos de forma filamentosa de *S. schenckii* numa reação de ELISA para o diagnóstico imunológico da esporotricose através da detecção de anticorpos em amostras de soro;
- Determinar quais os isotipos de imunoglobulinas são produzidos ao longo da infecção humana;
- Correlacionar a resposta imune humoral com as diferentes formas clínicas da esporotricose;
- Verificar o perfil de anticorpos dos pacientes ao longo do tratamento com itraconazol;
- Estudar bioquímica e imunologicamente o extrato de exoantígenos da forma filamentosa, caracterizando proteínas presentes na fração antigênica.

Materiais e métodos

Amostra fúngica

O isolado 23508 de *Sporothrix schenckii* foi utilizado em todo o decorrer do estudo. Este fungo foi isolado da poeira domiciliar de um paciente com esporotricose, que também possuía gatos infectados em sua residência. O isolado foi identificado através de testes bioquímicos, morfologia colonial (macroscopia da cultura) típica, ausência de peritécios em meio ágar batata dextrose (ABD) e aspecto microscópico do fungo em suas morfologias típicas a 25 e 37°C, conforme descrito na literatura (Rippon, 1988; Dixon *et al.*, 1991; Kwon-Chung & Bennett, 1992).

Este isolado em um estudo prévio foi comparado com outros isolados e foi demonstrada sua capacidade em produzir uma série de moléculas antigênicas em cultivo, apresentando forte reatividade quando testado com um soro hiperimune de coelho através da técnica de imunoblot (Almeida-Paes, 2004).

Este isolado fúngico encontra-se preservado na coleção de culturas de fungos do Serviço de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fiocruz, através dos métodos de liofilização, preservação em óleo mineral e em água destilada estéril. Culturas e repiques no decorrer do estudo foram realizados nos meios Agar Dextrose de Sabouraud e ABD e incubados à temperatura ambiente.

Amostragem de soros humanos

Para a padronização da técnica de ELISA indireta para sorodiagnóstico da esporotricose, foram selecionadas 90 amostras de soro de diferentes pacientes com esporotricose (21 do sexo masculino e 69 do sexo feminino, média de idade de 40,9±17,2 anos). Todos os soros foram colhidos no IPEC - Fiocruz entre Março de 2000 e Dezembro de 2004 e estocados congelados a -20°C até o momento do uso. O critério de inclusão de pacientes no estudo foi a presença de exame micológico positivo para esporotricose, baseado no isolamento de *S. schenckii* em cultura a partir de materiais clínicos obtidos de lesões desses pacientes. Os 90 pacientes apresentavam diferentes formas clínicas da infecção, a saber: cutânea fixa (n=22; 24,4%), linfocutânea (n=49; 54,4%), cutânea disseminada (n=16; 17,8%), extracutânea (n=2; 2,2%) e disseminada (n=1; 1,1%). Pacientes dos quais não foi possível isolar *S. schenckii* em cultivo micológico foram excluídos do estudo.

Para investigação da resposta imune humoral em pacientes com esporotricose, foram selecionados 76 soros de pacientes com esporotricose, diferentes dos pacientes analisados durante a padronização da técnica. Esses 76 pacientes foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo consistiu de 41 diferentes pacientes sem tratamento antifúngico (15 do sexo masculino e 26 do sexo feminino) com diferentes formas clínicas de esporotricose (8 com forma cutânea fixa, 11 com forma linfocutânea, 17 com forma cutânea disseminada e 5 com forma extracutânea) confirmadas por isolamento fúngico em cultura. O segundo grupo consistiu em 35 distintos pacientes com diferentes formas clínicas de esporotricose (12 com forma cutânea fixa, 16 com forma linfocutânea, 5 com forma cutânea disseminada e 2 com forma extracutânea) confirmada por isolamento fúngico em cultura os quais estavam recebendo itraconazol como tratamento antifúngico contra a infecção. A duração do tratamento nestes pacientes variou de 2 semanas a 13 meses. Os pacientes dos dois grupos são todos distintos entre si.

Os soros heterólogos selecionados para determinação da especificidade do teste também foram obtidos randomicamente da coleção de soros humanos do Serviço de Micologia do IPEC - Fiocruz. Ao todo foram selecionados 72 soros heterólogos de pacientes com isolamento dos respectivos agentes etiológicos de suas infecções em cultivo micológico, bacteriológico ou parasitológico. Foram selecionados desta forma 12 soros de pacientes com paracoccidioidomicose, 10 soros de pacientes com criptococose, 5 soros de pacientes com aspergilose, 15 soros de pacientes com histoplasmose, 12 soros de pacientes com tuberculose e 18 soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana, onde houve isolamento de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Todos esses soros foram colhidos antes do início do tratamento antifúngico (ou com antibióticos ou antimônio pentavalente, no caso de tuberculose e leishmaniose, respectivamente) e nenhum dos pacientes realizou teste intradérmico com esporotriquina.

Adicionalmente, foram selecionados 76 amostras de soro de indivíduos saudáveis, doadores de sangue, previamente testadas para HIV, Hepatite B, doença de Chagas e sífilis e apresentando resultados negativos em todos os referidos testes para serem utilizados como controles na padronização da técnica de ELISA. Para o estudo da resposta imune humoral foram utilizados outros 26 soros de indivíduos saudáveis, igualmente negativos em todas as provas imunológicas descritas acima.

Todas as amostras de soro acima descritas foram colhidas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, uma área endêmica de esporotricose (Barros *et al.*, 2004, Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). O uso desses soros neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC – Fiocruz.

Produção do antígeno

O extrato antigênico utilizado no decorrer de todo o trabalho foi produzido conforme descrito previamente (Mendoza *et al.*, 2002), com algumas modificações. O isolado 23508 de *S. schenckii* foi inoculado em sua forma filamentosa em um frasco do tipo Erlenmeyer contendo 200 mL de meio líquido de Sabouraud e incubado a 28°C a 100 rotações por minuto durante 14 dias. A massa de fungo inoculada consistiu no crescimento do fungo em um tubo de cultura contendo meio ABD após 10 dias de incubação. Após este período de incubação, o sobrenadante da cultura foi recolhido por centrifugação, esterilizado por filtração em membrana Millipore com poros de diâmetro de 0,22 µm e concentrado 10X por pervaporação. Após a concentração, adicionou-se timerosal ao extrato antigênico numa concentração de 1:5000 como conservante. O extrato antigênico foi armazenado em geladeira, a 4°C até o momento de seu uso.

A dosagem de proteínas totais do antígeno produzido foi determinada segundo a técnica descrita por Bradford (1976), empregando reagente comercial (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, USA), e albumina sérica bovina como padrão. Após o desenvolvimento da reação, a leitura da absorbância foi realizada utilizando-se espectrofotômetro com filtro de 595 nm de comprimento de onda.

SDS-PAGE

Esta técnica (Laemmli, 1970) foi utilizada para a análise unidimensional do extrato antigênico obtido, tanto para a separação de proteínas como para análise da reatividade pela técnica de imunoblot. Empregou-se um sistema que consistiu em gel de empilhamento na concentração a 4% e gel de separação a 7,5% de acrilamida/bisacrilamida, utilizando-se, para a montagem do gel e corrida eletroforética o sistema vertical BioRad Mini Protean III.

O gel de separação na concentração de 7,5% foi preparado seguindo a seguinte fórmula:

Acrilamida / Bisacrilamida 30% T / 2,7% C	3,0 mL
Solução tampão Tris 1,5 mol/L, pH 8,8	2,25 mL
Solução de SDS 10%	120 µL
Água destilada	6,75 mL
N, N, N', N' tetrametil etilenodiamina (TEMED)	4,00 µL
Solução de persulfato de amônio 10% (APS)	60,0 µL

Esta mistura foi colocada entre duas placas de vidro separadas por espaçadores de 0,75mm de espessura, coberta por uma camada de água destilada, deixada por aproximadamente 40 minutos à temperatura ambiente até a completa polimerização do gel.

Posteriormente, foi preparado o gel de empilhamento, na concentração de 4%, seguindo a seguinte fórmula:

Acrilamida/Bisacrilamida 30% T / 2,7% C	1,33 mL
Solução tampão Tris 0,5 mol/L, pH 6,8	2,5 mL
Solução de SDS 10%	100 µL
Água destilada	6,1 mL
TEMED	5,00 µL
APS	50,0 µL

Com o gel de separação totalmente polimerizado, retirou-se a camada de água que o cobria e a mistura acima foi então adicionada no espaço entre as placas, sendo colocado em seguida um pente com dente único de 67 mm.

O antígeno foi aplicado no gel com o auxílio de uma microseringa, após ter sido desnaturado, o que aconteceu com a diluição do antígeno 1:2 em tampão Tris-HCl 0,125 mol/L, pH 8,0 contendo 10% de β-mercaptoetanol, 20% de glicerol e 4% de SDS e posterior aquecimento do antígeno a 100°C por dez minutos. Também foi adicionado 3 µL de solução de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 80%, Tris 0,05 mol/L, pH 8,0) como marcador de corrida.

Foram utilizados padrões de peso molecular (BenchMarck™ Protein Ladder / Gibco, BRL, Gaithersburg, MD 20887, USA) contendo proteínas com massas de 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa para calcular a massa das proteínas reveladas no gel. Na transferência para membrana de nitrocelulose das proteínas separadas no SDS-PAGE foi utilizado padrão de peso molecular pré corado (BenchMark™ Pré-stained Protein Ladder / Gibco, BRL), para monitoramento da corrida eletroforética, confirmação da transferência de proteínas do gel para a membrana e comparação relativa dos pesos moleculares das bandas separadas pela eletroforese.

Para início da corrida eletroforética foi aplicada uma corrente de 15 mA, esta foi mantida até as amostras entrarem uniformemente no gel de separação, quando então a corrente foi aumentada para 30 mA. A corrida eletroforética foi finalizada quando o corante marcador da corrida atingiu a base do gel de separação.

Após o término da eletroforese de proteínas, o gel, quando usado para comparar o perfil protéico entre os isolados foi corado pelo azul brilhante de Coomassie (Neville & Glossman, 1974). Para tal, o gel foi imerso numa solução corante contendo 0,125% de azul

brilhante de Coomassie R-250 (Bio-Rad), 50% metanol e 10% de ácido acético por pelo menos uma hora, seguindo-se de banhos repetidos em solução descorante, idêntica à corante, só que sem o azul de Coomassie, até que a visualização das bandas estivesse nítida. Após o término da descoloração, o gel foi deixado em banho de imersão em solução contendo 50% de metanol e 0,5% de glicerol em água destilada por 20 minutos.

Quando necessário, ou seja, quando a visualização das bandas pelo Coomassie não ficasse nítida, o gel foi corado pela prata (Morrisey, 1981), utilizando reagente comercial (“Silver stain kit from BioRad”).

Imunoblot

Para avaliar a antigenicidade deste extrato antigênico produzido, após a realização da corrida eletroforética do mesmo, suas proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (Bio-Rad). A técnica utilizada foi a descrita por Tsang e colaboradores (1983). O gel de poliacrilamida contendo as proteínas separadas por eletroforese foi colocado em cima de uma membrana de nitrocelulose e estes colocados entre folhas de papel de filtro (Blotting paper – Sigma Chemicals, Co, St. Louis, Missouri, USA) embebidos em tampão de transferência (Tris 0,025 mol/L, glicina 0,192 mol/L, metanol 20%, pH 8,3). O conjunto foi colocado entre duas esponjas de 3 mm de espessura e preso com uma pinça plástica com perfurações em ambos os lados. Para a transferência, utilizou-se a cuba de transferência Mini-trans-blot cell (Bio-Rad) contendo tampão de transferência e um aparato resfriante, para evitar o superaquecimento do tampão, submetida a uma corrente de 397 mA por uma hora. Para determinar a eficácia da eletrotransferência das proteínas, um marcador de peso molecular pré-corado (Invitrogen) foi adicionado ao gel e visualizado na membrana de nitrocelulose.

Após a eletrotransferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão TBS (0,02 mol/L Tris-HCl, 0,5 mol/L NaCl, pH 7,5). A parte da membrana que continha o antígeno foi cortada em tiras de aproximadamente 3 mm, as quais foram utilizadas individualmente nas reações imunoenzimáticas, ou seja, cada uma foi incubada com uma mistura de soros diferentes: soros homólogos (mistura de soros de pacientes com esporotricose), soros heterólogos (mistura de soros de pacientes com doenças infecciosas que não esporotricose) e controle negativo (soro de indivíduos sadios, doadores de sangue).

Para a revelação imunoenzimática, a membrana foi incubada primeiramente com tampão TBS-TL (TBS + 0,2% Tween 20 + 5% leite desnatado) por uma hora, a fim de evitar possíveis ligações inespecíficas. A seguir, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T (TBS + 0,2% tween 20) e em seguida incubada por uma hora em TBS-TL contendo os soros humanos

diluídos 1:100, sob agitação constante. Ao final desta incubação, nova lavagem com TBS-T foi realizada como descrito anteriormente. Por fim, um anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, PA, USA), foi diluído 1:3.000 em tampão TBS-TL e incubado com a membrana por uma hora, sob agitação. A revelação da reação foi feita após lavagem da membrana com TBS-T utilizando-se azul de nitrotetrazólio e 5-bromo 4-cloro 3- indolil fosfato (BioRad) diluídos conforme instrução do fabricante em tampão apropriado (0,1 mol/L Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 mol/L NaCl, 5mmol/L MgCl₂.6H₂O). Após o aparecimento das bandas, foi lavada exaustivamente com água destilada.

ELISA

Para a padronização da técnica de ELISA indireta para diagnóstico imunológico da esporotricose foi seguido o protocolo descrito previamente por Kostiala & Kostiala (1981), com algumas modificações. A concentração e diluição ótimas de antígeno e de soro respectivamente foram determinadas por titulação pareada de diluições realizadas em base dois do antígeno empregado e de um soro humano com alto título de anticorpos contra *S. schenckii* e um soro humano de indivíduo saudável. O soro com alto título de anticorpos contra *S. schenckii* foi testado previamente pela técnica de imunodifusão radial dupla em gel de agar e apresentou linha de precipitação quando testado contra os exoantígenos de forma filamentosa (Almeida-Paes, 2004). A concentração ótima de antígeno e a diluição ótima de soro foram determinadas como sendo as condições em que obtivemos uma baixa leitura de densidade ótica do soro do indivíduo saudável e uma grande diferença entre as leituras de densidade ótica do soro homólogo e do soro normal.

A concentração ótima de antígeno (40 ng de proteína diluídos em 100 µL de tampão carbonato 63 mM, pH 9,6) foi colocada em cada poço de placas de 96 poços (Nunc-Immuno Starwell, MaxiSorp Surface) e em seguida as placas foram incubadas durante 90 minutos a 37°C e durante a noite em geladeira a 4°C. Após a sensibilização com o antígeno, as placas foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem (PBS - fosfato a 10mM e NaCl 0.15M - adicionado de 0,1% Tween 20, pH 7,3) e em seguida bloqueadas com reagente comercial (Superblock Blocking Buffer in PBS, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas como descrito acima. Seguiu-se a incubação das placas a 37°C durante uma hora com o soro dos pacientes, os quais foram diluídos 1:4.000 em tampão de incubação (10 mM PBS, 0,1% Tween 20, 5% leite desnatado, pH 7,3) e aplicados num volume de 100 µL em duplicata aos poços das placas. Novamente as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e

incubadas a 37°C por uma hora com anticorpo policlonal de cabra conjugado à peroxidase específico para a porção Fc da IgG total humana diluído 1:32.000 em tampão de incubação, conforme as instruções do fabricante (Jackson Immunoresearch Laboratories, PA) num volume final de 100 µL por poço. O desenvolvimento da reação enzimática iniciou-se após a lavagem das placas como descrito acima através da adição de 100 µL por poço de solução de 0,4 mg/mL de *o*-fenilenodiamina e 0,04% de peróxido de hidrogênio diluídos em tampão citrato (pH 5,5) a 37°C durante 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido clorídrico 3 mol/L por poço. As absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro para leitura de microplacas utilizando um filtro de comprimento de onda de 490 nm.

Para o estudo da resposta imune humoral dos pacientes com esporotricose utilizou-se o mesmo protocolo acima, com algumas modificações. Utilizaram-se placas Corning Inc. Costar polystyrene EIA/RIA plates as quais foram sensibilizadas com 40 ng de antígeno por poço diluídos em 100 µL por poço. A sensibilização, lavagens e o bloqueio foram realizados conforme descrito acima, utilizando-se TBS ao invés de PBS na formulação dos tampões. A incubação com soro dos pacientes também foi realizada nas mesmas condições, a não ser pela diluição dos soros que foi de 1:4.000 quando o objetivo era a pesquisa de IgG no soro, 1:1.000 para pesquisa de IgM e 1:800 para pesquisa de IgA. Estas diluições ótimas de soro também foram determinadas por titulação pareada conforme descrito anteriormente. Os anticorpos conjugados utilizados específicos contra IgG, IgM e IgA foram diluídos 1:2.000 em tampão de incubação conforme instruções do fabricante (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Devido ao fato destes anticorpos estarem conjugados à fosfatase alcalina, a reação enzimática foi realizada com a adição de 100 µL por poço de solução de *p*-nitrofenil fosfato 1,0 mg/mL em tampão glicina 0,1 M contendo 1 mM MgCl₂ e 1 mM ZnCl₂, pH 10,4. A reação foi interrompida após 30 minutos de incubação a 37°C com adição de 25 µL de solução NaOH 3 mol/L por poço. Absorbâncias foram então lidas a 405 nm.

Para cada experimento dois controles foram realizados: o primeiro controle foi realizado para verificar possíveis interações inespecíficas do anticorpo secundário com o antígeno sensibilizado na placa e o segundo foi um controle em branco. Estes controles consistiram respectivamente de poços em duplicata sensibilizados com antígeno onde não foram aplicados soros humanos, mas o conjugado foi adicionado na diluição descrita acima e em poços duplicados onde somente o sistema revelador foi adicionado, sem adição de soro, anticorpo conjugado nem de antígeno.

Todos os experimentos foram realizados duas vezes no mínimo, a fim de se determinar a reprodutibilidade dos ensaios.

O valor de absorvância de cada soro em todos os experimentos realizados foi a média aritmética dos valores obtidos na duplicata onde o soro foi aplicado.

Com base no número de pacientes com esporotricose e controles positivos e negativos foram determinados sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de probabilidade positiva e razão de probabilidade negativa para cada teste. A sensibilidade indica a probabilidade do teste ser positivo, dado que existe a doença. Especificidade indica a probabilidade do teste ser negativo, dado que não existe a doença. Eficiência demonstra a probabilidade do teste diagnosticar corretamente pacientes com e sem a doença. O valor preditivo positivo é a probabilidade de existir a doença, já que o resultado do teste foi positivo, enquanto que o valor preditivo negativo é a probabilidade de não existir a doença, dado o resultado negativo do exame. A razão de probabilidade positiva é a razão entre a probabilidade do teste ser positivo dado que existe a doença pela probabilidade do teste ser positivo dado que não existe a doença. A razão de probabilidade negativa por sua vez é a razão entre a probabilidade do teste ser negativo dado que existe a doença pela probabilidade do teste ser negativo dado que não existe a doença.

Cálculo de pontos de corte

Para o experimento de padronização da ELISA para diagnóstico da esporotricose através da detecção de IgG no soro dos pacientes, o ponto de corte para reatividade contra os exoantígenos de forma filamentosa de *S. schenckii* foi determinado como sendo a média dos valores de densidade ótica dos soros de indivíduos saudáveis mais três vezes o desvio padrão das leituras de densidade ótica destes mesmos soros. Em probabilidade e estatística, o desvio padrão é a medida mais comum da dispersão estatística. De uma distribuição normal unimodal, simétrica, de afunilamento médio (ou mesocúrtica) pode-se dizer o seguinte: 68% dos valores encontram-se a uma distância da média inferior a um desvio padrão; 95% dos valores encontram-se a uma distância da média inferior a duas vezes o desvio padrão; 99,7% dos valores encontram-se a uma distância da média inferior a três vezes o desvio padrão. Assim sendo, esta forma de cálculo de ponto de corte foi escolhida neste experimento a fim de diminuir ao máximo o número de reações falso-positivas.

Para os experimentos de estudo da resposta imune humoral em pacientes com esporotricose os pontos de corte foram determinados através da construção de curvas TG-ROC, como descrito previamente (Greiner *et al.*, 1995). Esta curva é realizada através da plotagem dos valores de sensibilidade e de especificidade da reação (eixo y) contra os diferentes valores de densidade ótica observados no experimento (eixo x), e o ponto de corte corresponde à intersecção entre as duas curvas geradas no gráfico. Este tipo de abordagem em

geral permite a obtenção de um ponto de corte com especificidade e sensibilidade ótimas. Para construção destas curvas somente soros de pacientes com esporotricose sem tratamento antifúngico foram utilizados, visto que o tratamento antifúngico pode alterar a resposta imune humoral nas infecções fúngicas (Esterre *et al.*, 2000; Valle *et al.*, 2001).

Em todos os casos descritos acima, amostras com valores de absorvância acima do ponto de corte foram consideradas positivas e aquelas com valores menores ou iguais ao ponto de corte foram consideradas negativas.

Espectrometria de massas

A fim de se caracterizarem proteínas antigênicas de *S. schenckii*, foram selecionadas através da técnica de imunoblot duas bandas proteicas presentes no exoantígeno de forma filamentosa de *S. schenckii*, uma que reagiu imunologicamente somente com o pool de soros de pacientes com esporotricose e outra que apresentou reatividade cruzada com o pool de soros de pacientes com outras doenças infecciosas.

Imediatamente após a eletroforese e coloração pelo Coomassie blue, o gel foi exaustivamente lavado com água destilada e as bandas de interesse foram cortadas do gel com o auxílio de um bisturi estéril. Acetonitrila (0,1 mL de solução 50% em 50 mM NH_4HCO_3) foi adicionada a cada amostra, as quais foram misturadas vigorosamente utilizando vortex por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido três vezes. Os pedaços de gel foram secos em Centri-Vap, a 45°C por 20 minutos. Um volume de 0,1 mL de ditiotreitol contendo 10 mM NH_4HCO_3 foi adicionado aos pedaços secos de gel e agitados em vórtex brevemente. Essa mistura foi incubada em repouso, a 56°C por uma hora. Em seguida, o sobrenadante foi removido e iodoacetamida (0,1 mL de solução contendo 25 mM NH_4HCO_3) foi adicionada aos pedaços de gel, os quais foram em seguida agitados em vórtex. As suspensões foram incubadas a temperatura ambiente por 45 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado e os pedaços do gel foram lavados com solução 25 mM de NH_4HCO_3 . O sobrenadante novamente foi descartado e os pedaços do gel foram tratados com acetonitrila (0,1 mL de solução 50% em 50 mM NH_4HCO_3) duas vezes. Os pedaços de gel foram novamente secos conforme descrito acima. Para cada gel, 0,1 mL de solução de tripsina (13 mg/mL em 25 mM NH_4HCO_3) foi adicionado. Essa mistura foi incubada a 37°C por 19 horas. Após esta incubação 0,1 mL de água destilada foi adicionada a cada amostra. Cada amostra foi agitada em vórtex por 10 minutos e depois submetida a ultra som em um sonicador. A solução resultante em cada tubo foi transferida para um tubo de centrífuga contendo 5 μL de solução de acetonitrila 50%, ácido trifluoroacético 5%. Ao restante do gel que sobrou, 50 μL da solução acima foi adicionado, seguido por 10 minutos de agitação em vórtex e 5 minutos de

ultra som. Esse procedimento foi repetido duas vezes e todas as soluções misturadas. A mistura final foi concentrada até um volume de 25 μ L.

Análise por MALDI-TOF-MS foi realizada utilizando um espectrômetro de massas Micromass QTOF-2, como descrito previamente (Winters & Day, 2003).

Identificação das proteínas

Após a obtenção dos valores de peso molecular dos peptídeos obtidos na digestão com tripsina, estes valores foram colocados em um algoritmo computacional para a identificação das proteínas. O algoritmo utilizado foi o programa Protein Prospector, desenvolvido pela Universidade da Califórnia, São Francisco (<http://prospector.ucsf.edu/>), o qual é utilizado por diversos laboratórios que trabalham com atividades que envolvem proteômica (Chalkley *et al.*, 2005). O processo envolveu a entrada dos valores dos pesos moleculares dos peptídeos obtidos para cada proteína no algoritmo, o qual faz uma busca contra uma seqüência proteica previamente digerida em uma base de dados. Parâmetros como tolerância de massas e carbamidometilação (que modifica resíduos de cisteína aumentando a eficácia da digestão pela tripsina) foram selecionados e a busca realizada. Após identificação dos peptídeos, uma busca BLASTp foi realizada contra o banco de dados de proteínas do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinação do homólogo mais próximo aos peptídeos obtidos.

Análise de antigenicidade

A análise de antigenicidade foi realizada através de ferramentas de bioinformática. A seqüência da proteína foi analisada através do software Protean versão 7.0, DNASTAR, Inc. Os gráficos gerados foram estudados, verificando regiões de alta antigenicidade, hidrofobicidade e flexibilidade, a fim de verificar a existência de prováveis epítomos B na molécula.

Análise estatística

Comparação de médias entre diferentes grupos foi realizada através do teste *t* de Student não pareado utilizando o programa computacional GraphPad Prism 3.0. Análises de correlações foram feitas por ANOVA utilizando o software SigmaPlot 2000. Comparações entre pacientes com esporotricose, pacientes heterólogos e indivíduos normais foi feita utilizando o teste Qui-quadrado. Valores de $P \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Além destas análises, para a determinação do poder discriminatório dos testes realizados, foram construídas curvas ROC para cada ELISA realizada, utilizando-se o programa SPSS 14.0 para Windows, na qual sensibilidade e especificidade são calculadas como uma função de diferentes pontos de corte. Nesta análise o valor de (1-especificidade) é plotado contra o valor de sensibilidade e o valor da área sob a curva é calculado.

Resultados

Características morfológicas do isolado utilizado

Em todas as análises deste estudo foi utilizado o isolado 23508 de *S. schenckii* nas análises. Este isolado foi estudado quanto às suas características macro e micromorfológicas, em suas duas distintas morfologias, a saber, micélio e levedura, as quais podem ser observadas na Figura 1.

Quando o fungo foi semeado em meio ABD e incubado a uma temperatura de 25°C observou-se o crescimento de uma colônia glabra, inicialmente hialina e que, após sete dias de crescimento começou a apresentar áreas escuras, que com o passar do tempo se tornaram negras (Figura 1A). Mesmo após dois meses de crescimento não foram observadas quaisquer estruturas de reprodução sexuada, em especial peritécios, o que permite a diferenciação de *S. schenckii* com *O. stenoceras*, espécie não patogênica, extremamente relacionada (Dixon *et al.*, 1991). O mesmo fungo, crescido em meio BHI ágar e incubado à temperatura de 37°C demonstrou conversão à forma leveduriforme, apresentando colônias cremosas, de cor esbranquiçada que com o passar do tempo adquiriram a tonalidade creme (Figura 1B).

Análise micromorfológica da forma filamentosa foi realizada através da confecção de cultura em lâmina do isolado crescido durante 15 dias a 25°C em meio ABD. Este isolado apresentou, quando observado em microscopia óptica de campo claro em aumento de 1000X, hifas hialinas septadas e ramificadas bastante finas, muitas delas formando sinêmios. Dois tipos de conídios puderam ser observados: conídios hialinos elipsoides, os quais se originavam de forma simpodial a partir de pequenos conidióforos originados da hifa e conídios demáceos piriformes, originados a partir das hifas (Figura 1C). A microscopia da forma leveduriforme foi observada retirando um pequeno fragmento da colônia com auxílio de uma alça de platina, o qual foi colocado em uma lâmina de microscopia contendo uma gota de lactofenol azul de algodão. A lâmina foi fechada com uma lamínula e observada em microscópio óptico de campo claro, em uma magnitude de 400X e 1000X. Foi possível observar que mais que 95% das células observadas apresentavam-se na forma leveduriforme, comprovando assim a capacidade dimórfica deste isolado. As leveduras observadas eram pequenas, unibrotantes e muitas delas apresentavam forma de charuto (Figura 1D).

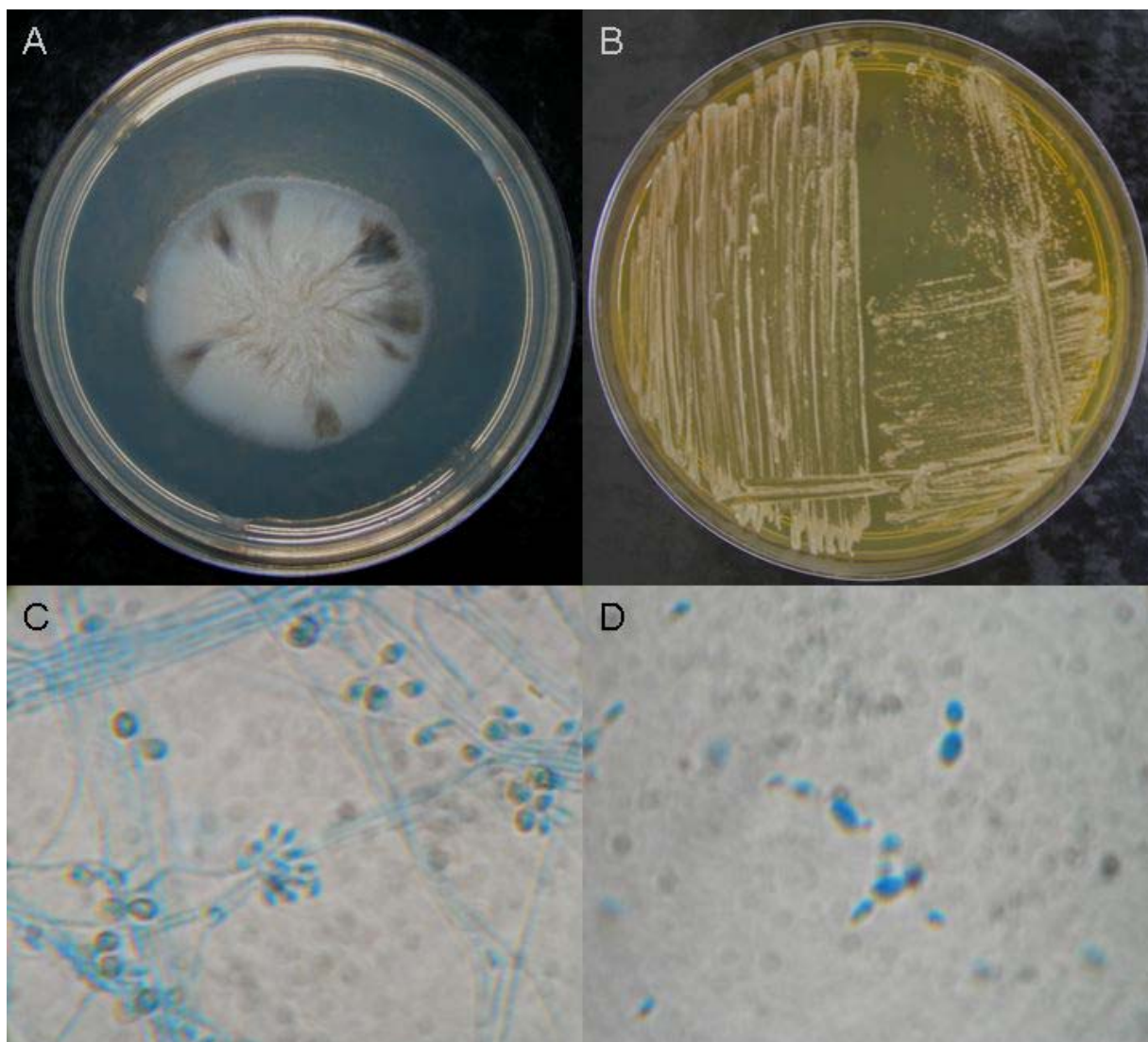


Figura 1: Aspectos macro (A e B) e micromorfológicos (C e D) do isolado de *S. schenckii* 23508 em suas formas filamentosas (A e C) e leveduriforme (B e D). Culturas foram realizadas em meio ABD (A) ou BHI (B) e incubadas a temperatura de 25°C e 37°C respectivamente. Microscopia em C foi realizada através da técnica de cultura em lâmina. Em D utilizou-se um pequeno fragmento de uma colônia crescida na placa mostrada em B para a montagem da lâmina.

Análise do extrato antigênico

O exoantígeno da forma filamentosas do isolado 23508 de *S. schenckii* obtido após incubação a 28°C sob agitação em meio Sabouraud líquido apresentou uma concentração de proteínas de 280 µg/mL, conforme determinado utilizando o método de Bradford (1976). A análise da preparação antigênica em gel de poliacrilamida pode ser verificada na Figura 2. O gel de poliacrilamida (7,5%) corado pela prata após eletroforese mostrou a presença de cinco bandas proteicas, de pesos moleculares de 90, 70, 63, 51 e 42 kDa, com as bandas de 51 e 63 kDa sendo as mais proeminentes.

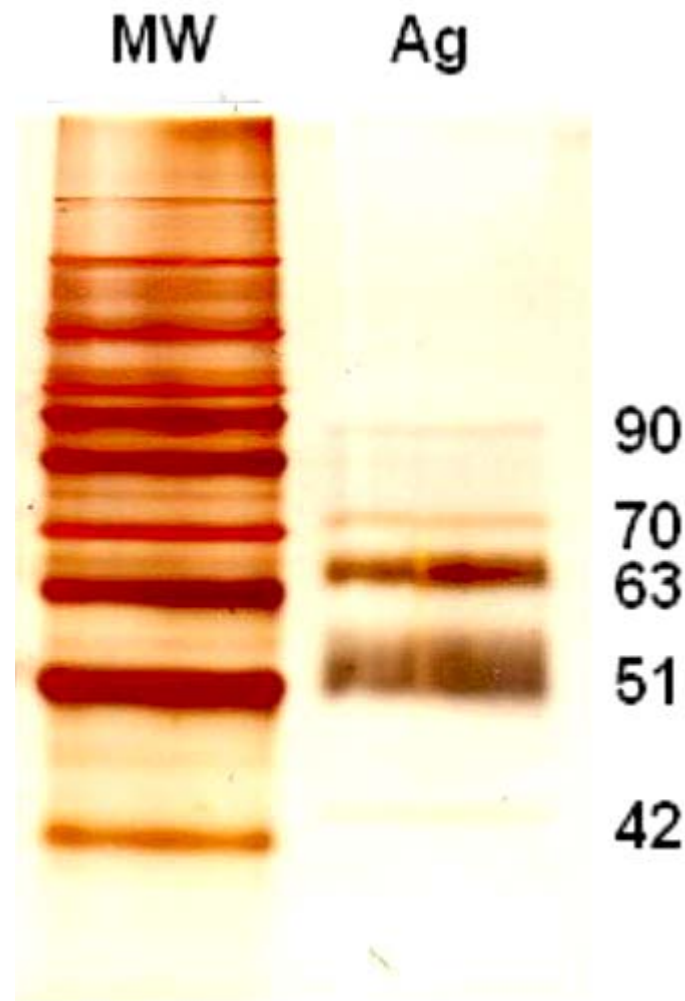


Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela prata dos exoantígenos da forma filamentosa do isolado 23508 de *S. schenckii*. MW – padrão de peso molecular; Ag – antígeno. Os pesos moleculares (em kDa) das cinco bandas proteicas detectadas por esta técnica estão indicados à direita.

Padronização da técnica de ELISA

Reatividade sorológica no ensaio

A reatividade sorológica contra os exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* foi estudada através da técnica de ELISA. O valor do ponto de corte para este ensaio foi definido como sendo a média dos valores de densidade ótica dos soros de indivíduos saudáveis mais três vezes o desvio padrão das leituras de densidade ótica destes mesmos soros. Assim sendo, amostras com uma média de valores de absorvância ótica acima de 0,582 foram consideradas positivas (Figura 3). Com este ponto de corte, nenhum dos 76 soros de indivíduos saudáveis (doadores de sangue negativos para HIV, Hepatite B, Doença de Chagas e sífilis) foram positivos.

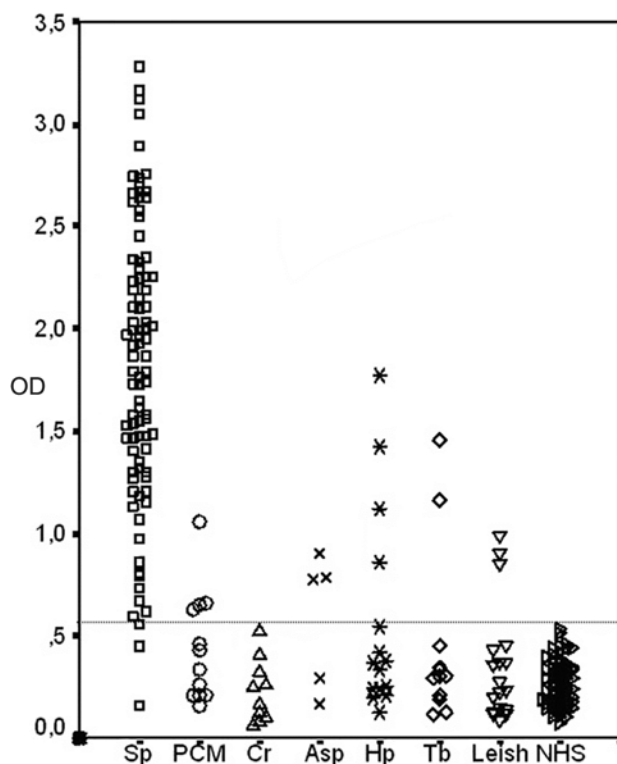


Figura 3: Resposta de anticorpos da classe IgG contra os exoantígenos de forma filamentosa de *S. schenckii* nos soros de pacientes com esporotricose, pacientes com outras doenças infecciosas e de indivíduos saudáveis. A linha pontilhada horizontal representa o ponto de corte da reação. OD – densidade ótica, Sp – esporotricose, PCM – paracoccidioidomicose, Cr – criptococose, Asp – aspergilose, Hp – histoplasmose, Tb – tuberculose, Leish – leishmaniose tegumentar americana, NHS – soros de indivíduos normais (controles negativos).

A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados obtidos em cada grupo de doenças infecciosas estudado. Dos 90 soros de pacientes com esporotricose somente 3 amostras apresentaram resultado negativo. O teste Qui-quadrado mostrou diferença estatisticamente significativa entre a resposta de anticorpos dos pacientes com esporotricose e os controles negativos ($\chi^2 = 154,37$, $P < 0,0001$). Um total de 72 soros heterólogos também foi testado e 16 deles apresentaram valores de absorvância acima do ponto de corte, sendo por isso considerados positivos. Mais uma vez, o teste Qui-quadrado mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os soros homólogos e heterólogos ($\chi^2 = 95,73$; $P < 0,0001$), bem como entre os soros heterólogos e os indivíduos normais ($\chi^2 = 18,94$; $P < 0,0001$).

Tabela 1: Resultados da ELISA para detecção de IgG contra exoantígenos de *S. schenckii*.

Grupo de pacientes (número)	Número de pacientes positivos (%)	Média \pm desvio padrão das absorvâncias
Esporotricose (90)	87 (97)	1.824 \pm 0.681
Paracoccidioidomicose (12)	4 (33)	0.440 \pm 0.267
Criptococose (10)	0 (0)	0.230 \pm 0.153
Aspergilose (5)	3 (60)	0.585 \pm 0.330
Histoplasmose (15)	4 (27)	0.567 \pm 0.499
Tuberculose (12)	2 (17)	0.441 \pm 0.421
Leishmaniose (18)	3 (17)	0.353 \pm 0.283
Indivíduos saudáveis (76)	0 (0)	0.261 \pm 0.107

Curva ROC e parâmetros do teste

A Figura 4 mostra a curva ROC obtida na padronização da técnica de ELISA no sorodiagnóstico da esporotricose. A área calculada sob a curva foi de 0.9767 ± 0.0085 . De acordo com os estudos realizados por Greiner e colaboradores (2000), este valor permite classificar a ELISA padronizada como um ensaio com excelente acurácia para o diagnóstico sorológico da esporotricose.

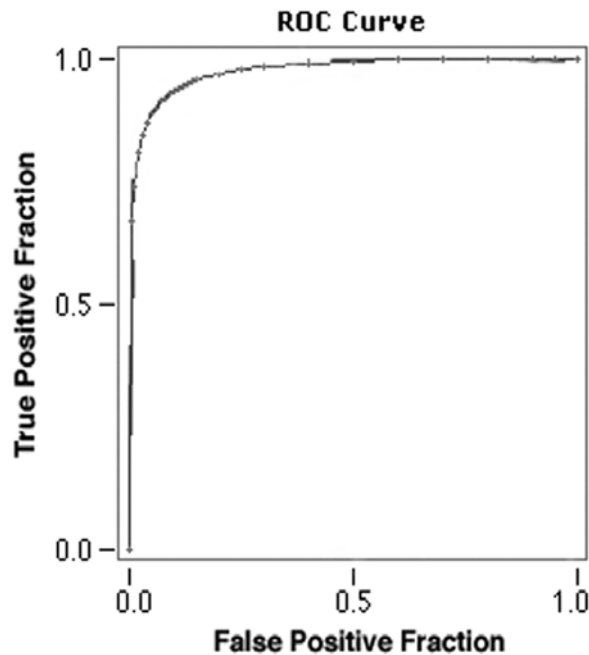


Figura 4: Curva ROC obtida na padrnização da técnica de ELISA para esporotricose utilizando exoantígenos de forma filamentosa de *S. schenckii*. A área sob a curva foi de 0.9767 ± 0.0085 .

Conforme pode ser verificado na tabela 2, o teste apresentou uma sensibilidade de 97%, especificidade de 89% e uma eficiência de 92%, corroborando os resultados encontrados na análise da curva ROC descritos acima.

Tabela 2: Parâmetros sorológicos do ELISA descrito.

Parâmetro	Valor	Intervalo de confiança 95%
Sensibilidade	97%	90.57 – 99.31%
Especificidade	89%	83.04 – 93.69%
Eficiência	92%	87.81 – 95.13%
Valor preditivo positivo	84%	76 – 90.85%
Valor preditivo negativo	98%	93.64 – 99.54%

Comparação da resposta entre as diferentes formas clínicas da esporotricose

Um total de 90 soros de pacientes com esporotricose foi analisado através da técnica de ELISA e três deles apresentaram resultados negativos. Esses soros eram provenientes de um paciente com a forma linfocutânea da esporotricose, outro com a forma cutânea disseminada e o último com a forma extracutânea da esporotricose. Todos os soros de pacientes com a forma cutânea fixa da esporotricose apresentaram resultados positivos. A Figura 5 apresenta os valores de absorbância de cada soro de acordo com a respectiva forma clínica da esporotricose. O teste *t* de Student não mostrou diferença significativa entre as formas clínicas estudadas.

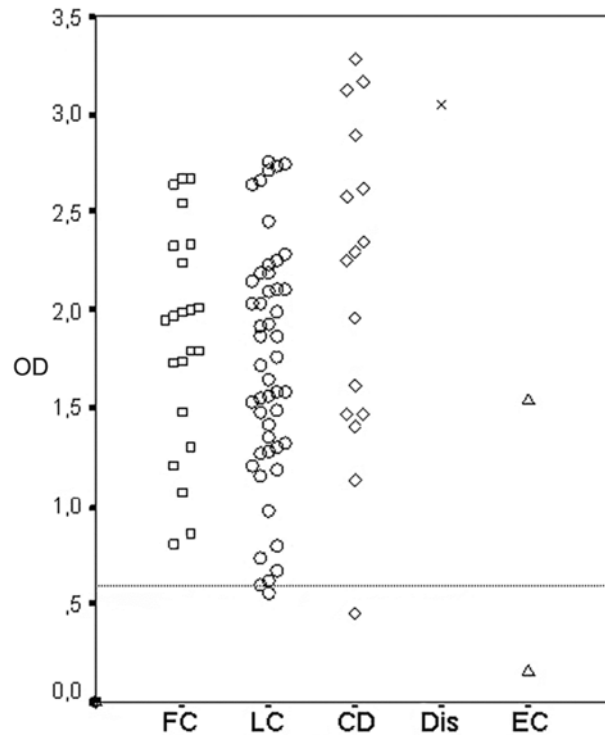


Figura 5: Resposta de anticorpos da classe IgG em pacientes com diferentes formas clínicas de esporotricose na técnica de ELISA. A linha pontilhada horizontal representa o ponto de corte da reação. OD – densidade ótica, FC – forma cutânea fixa, LC – forma linfocutânea, CD – forma cutâneo-disseminada, Dis – forma disseminada, EC – forma extracutânea.

Reações cruzadas

Para verificar possíveis reações cruzadas no ensaio de ELISA padronizado, 72 soros de pacientes com diferentes doenças infecciosas que podem ser clinicamente confundidas com esporotricose foram utilizados neste estudo. Verificou-se que 78% dos soros heterólogos estudados apresentou resultado negativo no teste. Dos 16 soros que apresentaram valores de absorbância acima do ponto de corte, 4 são provenientes de pacientes com paracoccidiodomicose, outros 4 foram de pacientes com histoplasmose, 3 foram de pacientes com aspergilose, 3 de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e os dois últimos de pacientes com tuberculose. Nenhum dos 10 soros de pacientes infectados por *C. neoformans*

apresentou resultado positivo, o que pode ser verificado na Tabela 1, bem como na Figura 3. O teste Qui-quadrado mostrou diferença estatisticamente significativa entre o número de soros positivos e negativos dentre as doenças testadas e o número de soros positivos e negativos dos pacientes com esporotricose ($\chi^2 = 95,73$; $P < 0,0001$).

A média de leituras de absorvâncias obtidas dos soros dos 90 pacientes com esporotricose comparada à média de leituras dos 76 soros provenientes de indivíduos saudáveis foi estatisticamente significativa, como analisado pelo teste t não-pareado de Student ($t = 22,69$; $P < 0,0001$). De forma similar, os valores de absorvância dos soros de pacientes com esporotricose e demais heterólogos foi estatisticamente diferente ($t = 19,19$; $P < 0,0001$), bem como os valores de absorvância dos soros heterólogos e dos soros controles negativos ($t = 3,13$; $P = 0,002$).

Reprodutibilidade do ensaio

Para verificar a reprodutibilidade do ELISA descrito, os valores de densidade ótica de cada soro obtido em dois diferentes testes realizados em dias diferentes foram comparados. A reprodutibilidade do teste pode ser analisada na Figura 6. O coeficiente de correlação (r^2) encontrado foi de 0,9608, mostrando uniformidade entre os diferentes ensaios realizados durante a padronização desta técnica imunoenzimática.

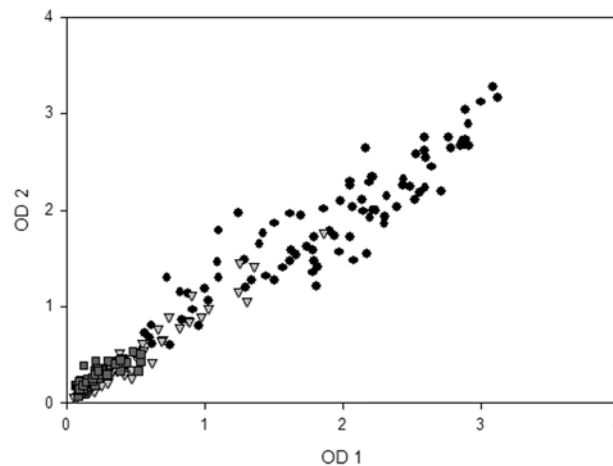


Figura 6: Distribuição e reprodutibilidade dos resultados do ELISA em dois experimentos distintos. Símbolos: ● soros homólogos, ▼ soros heterólogos ■ soros de indivíduos normais. OD1 – densidade ótica no primeiro experimento, OD2 – densidade ótica no segundo experimento. O coeficiente de correlação entre os dois experimentos foi de 0,9608.

Pesquisa de isotipos de anticorpos na esporotricose

Curvas TG-ROC e determinação do ponto de corte

As curvas TG-ROC para a detecção de IgG, IgM e IgA reativas contra exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* estão apresentadas na Figura 7. A análise destas curvas mostrou valores de pontos de corte de 0,418; 0,284 e 0,223 para a detecção de anticorpos da classe IgG (Figura 7A), IgM (Figura 7B) e IgA (Figura 7C) respectivamente.

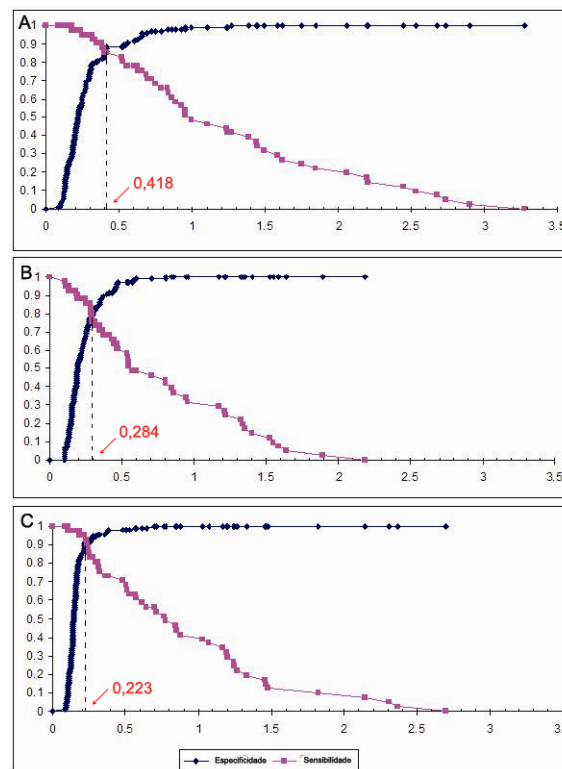


Figura 7: Curvas TG-ROC na detecção de anticorpos da classe IgG (A), IgM (B) ou IgA (C) através da técnica de ELISA na esporotricose. A intersecção entre as duas curvas de cada gráfico representa o ponto de corte de cada reação. Os gráficos representam a relação entre os valores de sensibilidade e especificidade (eixo y) e os valores de densidade ótica (eixo x) para cada ensaio imunoenzimático.

Detecção de anticorpos nos soros de pacientes com esporotricose

A figura 8A apresenta os valores de densidade ótica para IgG em cada soro proveniente de pacientes com diferentes formas clínicas de esporotricose antes do início da terapia antifúngica (n=41). Todos os soros de pacientes com a forma fixa da doença foram positivos. Dois pacientes com a forma linfocutânea, 3 com a forma cutânea disseminada e um com esporotricose extracutânea foram negativos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias de absorvância das diferentes formas clínicas estudadas.

Na figura 8B verificamos os valores de densidade ótica para detecção de IgG dos soros dos pacientes com esporotricose durante o tratamento com itraconazol. Três soros foram negativos neste ensaio, sendo um de paciente com a forma cutânea fixa, outro de um paciente com a forma linfocutânea e o último de um paciente com a forma cutânea disseminada da

esporotricose. Estes pacientes estavam sob tratamento antifúngico por 10, 11 e 4 meses respectivamente.

A reatividade de anticorpos da classe IgM em soros de pacientes com esporotricose antes do início do tratamento antifúngico pode ser verificada na figura 8C. Assim como na detecção de IgG, todos os pacientes com a forma cutânea fixa apresentaram valores de absorvância para IgM acima do valor do ponto de corte. Por outro lado, outros seis pacientes apresentaram resultados negativos para a reatividade de IgM contra exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii*: um paciente apresentava a forma linfocutânea, outros 4 apresentavam a forma cutâneo-disseminada e um paciente possuía a forma extracutânea da esporotricose. Semelhantemente ao observado para IgG, o teste *t* de Student também não mostrou diferenças estatisticamente significantes quando comparadas as médias de densidade ótica na reação para detecção de IgM no soro de pacientes com diferentes formas clínicas da esporotricose.

A figura 8D apresenta os níveis de IgM em pacientes com esporotricose fazendo uso de itraconazol. Verificou-se que um total de 10 pacientes (3 com a forma cutânea fixa e 7 com a forma linfocutânea) foram negativos neste teste.

Os perfis de reatividade para anticorpos da classe IgA contra os exoantígenos de *S. schenckii* em pacientes com esporotricose antes e durante o tratamento antifúngico com itraconazol estão demonstradas nas figuras 8E e 8F respectivamente. Dois pacientes foram negativos quando testados antes do início da terapia antifúngica, um deles apresentando a forma cutâneo disseminada e outro apresentando a forma extracutânea da esporotricose. Estes dois pacientes também apresentaram resultados negativos quando testados para IgG e IgM. Em nenhum dos dois pacientes foi verificada imunossupressão. Quatro pacientes recebendo terapia antifúngica com itraconazol apresentaram resultados negativos no ensaio imunoenzimático. Destes quatro pacientes, um deles apresentava a forma cutânea fixa e os outros três possuíam a forma linfocutânea da esporotricose. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias de densidade ótica das diferentes formas clínicas estudadas no grupo de pacientes não tratados, assim como no grupo de pacientes recebendo itraconazol.

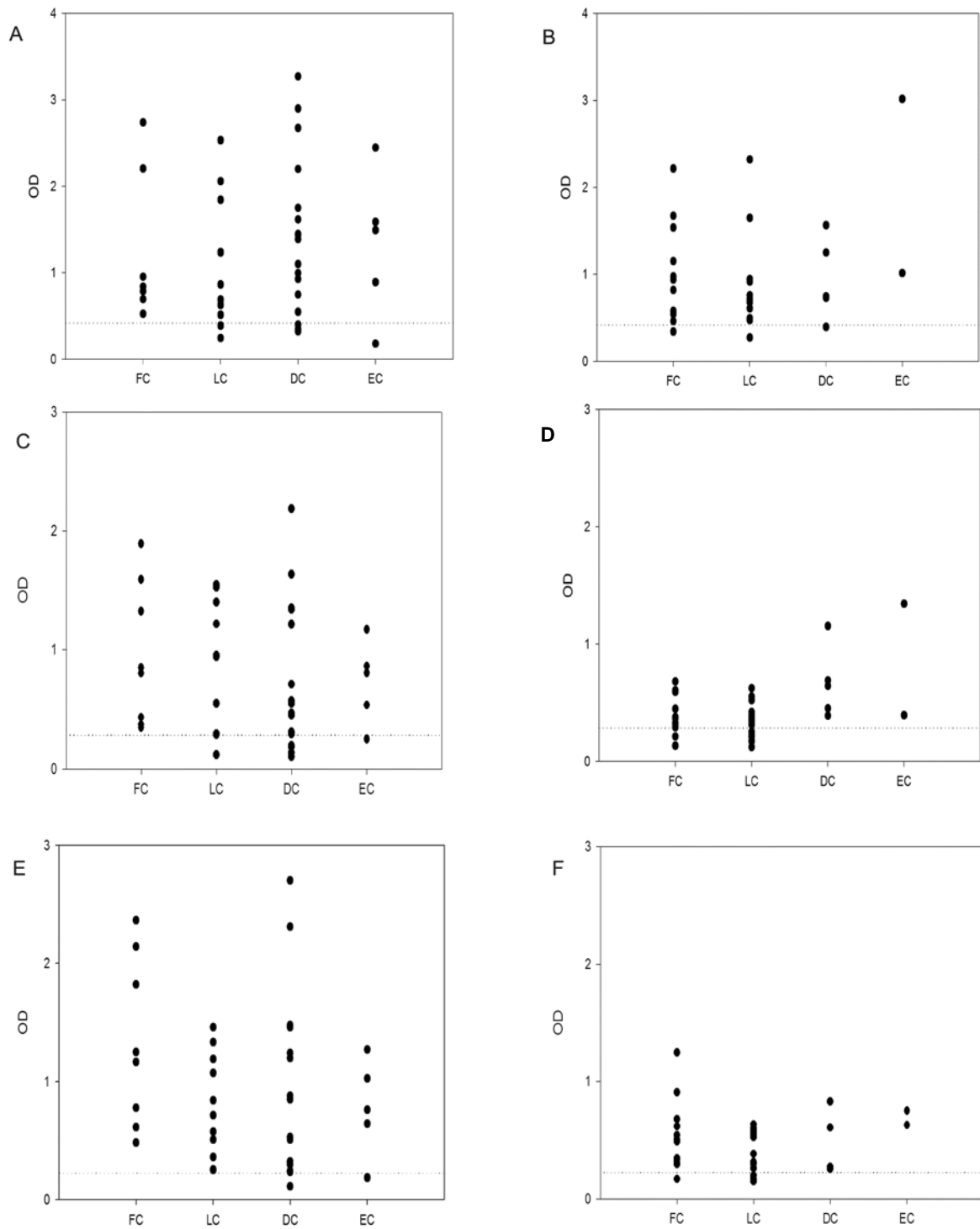


Figura 8: Níveis de anticorpos em pacientes com diferentes formas clínicas de esporotricose contra exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii*. IgG (A, B), IgM (C, D) e IgA (E, F) ELISA em pacientes antes do início da terapia antifúngica (A, C, E) e durante o uso de itraconazol (B, D, F). Linhas pontilhadas horizontais indicam o ponto de corte de cada reação. OD – densidade ótica, FC – forma cutânea fixa, LC – forma linfocutânea, DC – forma cutânea disseminada, EC – forma extracutânea.

Perfil de anticorpos em pacientes sob terapia antifúngica

Os 35 pacientes com esporotricose recebendo itraconazol como terapia contra a infecção foram capazes de produzir anticorpos de pelo menos uma classe em níveis que pudessem ser detectados nos ELISAs realizados para pesquisa de IgG, IgM e IgA. Vinte e dois pacientes (62,9%) apresentaram níveis detectáveis dos três isotipos pesquisados, 9 pacientes (25,7%) apresentaram dois isotipos de anticorpos detectáveis e 4 pacientes (11,4%) foram positivos em apenas um isotipo. A Figura 9 compara os níveis de anticorpos dos pacientes com esporotricose antes e durante a terapia antifúngica. Foi verificada diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre as médias de densidade ótica na pesquisa de IgM e IgA dos pacientes ainda não tratados ($0,795 \pm 0,086$ e $0,926 \pm 0,102$, respectivamente) e dos pacientes fazendo uso de itraconazol ($0,425 \pm 0,044$ e $0,467 \pm 0,040$, respectivamente). Embora tenha sido detectada uma diminuição dos níveis de anticorpos da classe IgG nos pacientes com esporotricose em uso de itraconazol ($1,282 \pm 0,128$ nos pacientes antes do tratamento e $0,952 \pm 0,104$ no grupo de pacientes em tratamento), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P = 0,0533$).

A análise da terapia antifúngica em cada uma das formas clínicas de esporotricose estudadas está representada na Tabela 3. Diminuições significantes foram verificadas nos níveis de IgM e IgA nos pacientes com a forma cutânea fixa e linfocutânea no grupo de pacientes em tratamento. Nenhuma diferença estatística foi verificada nos níveis de IgG das diferentes formas clínicas entre os pacientes sem tratamento e em tratamento, fato idêntico ao observado nos grupos de pacientes com as formas cutaneo-disseminada e extracutânea com relação a anticorpos das classes IgM e IgA.

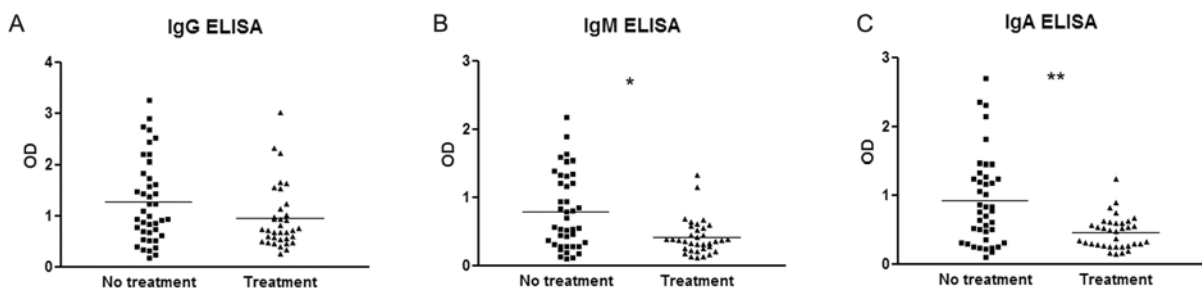


Figura 9: Comparação entre a resposta IgG (A), IgM (B) e IgA (C) nos soros de pacientes com esporotricose sem tratamento antifúngico e durante tratamento com itraconazol. * $P = 0,0005$; ** $P = 0,0002$. As linhas horizontais representam a média de OD (densidade ótica) de cada um dos grupos analisados.

Tabela 3: Respostas de IgG, IgM e IgA contra exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* em pacientes com diferentes formas clínicas de esporotricose antes e durante a terapia antifúngica com itraconazol.

Isotipo de anticorpo	Forma clínica	Média ± DP das absorvâncias		Valor de P^a
		Antes do tratamento	Durante o tratamento	
IgG	FC ^b	1,212 ± 0,8031	0,9828 ± 0,5704	0.4645
	LC ^c	1,112 ± 0,7479	0,7996 ± 0,5078	0.2071
	DC ^d	1,416 ± 0,9043	0,9376 ± 0,4650	0.2739
	EC ^e	1,319 ± 0,8453	2,015 ± 1,4149	0.4375
IgM	FC	0,9507 ± 0,5903	0,3742 ± 0,1793	0.0049*
	LC	0,8296 ± 0,5437	0,3317 ± 0,1446	0.0017*
	DC	0,7190 ± 0,6058	0,6656 ± 0,3008	0.8529
	EC	0,7243 ± 0,3488	0,8685 ± 0,6718	0.7071
IgA	FC	1,327 ± 0,7116	0,5356 ± 0,3004	0.0028*
	LC	0,7783 ± 0,4329	0,3933 ± 0,1692	0.0034*
	DC	0,8770 ± 0,7641	0,4459 ± 0,2605	0.2358
	EC	0,7769 ± 0,4106	0,6885 ± 0,08768	0.7863

^a Valor P calculado pelo teste t de Student; ^b FC – cutânea fixa; ^c LC – linfocutânea; ^d DC – cutaneo-disseminada; ^e EC – extracutânea * $P < 0,05$.

Com a finalidade de verificar se a duração do tratamento antifúngico interfere nos níveis de anticorpos na esporotricose, foi estudada a correlação entre o tempo de tratamento com itraconazol e a densidade ótica do soro de cada paciente para cada um dos três isotipos estudados (Figura 10). Foi verificada uma diminuição dos níveis de anticorpos quando o tempo de uso de itraconazol aumentou, embora somente para IgG e para IgM esta correlação tenha sido significativa, com valores de P iguais a 0,004, 0,0160 e 0,074 para IgG, IgM e IgA, respectivamente.

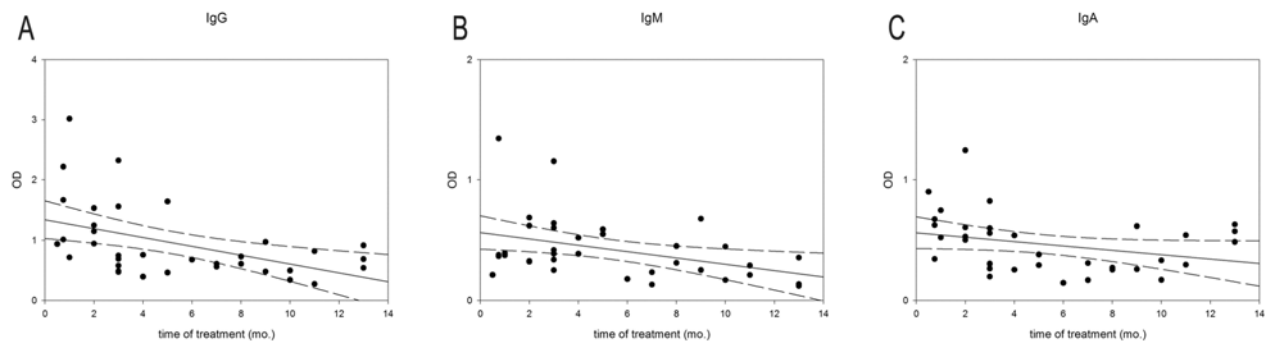


Figura 10: Correlação entre o tempo de tratamento (eixo x) e os níveis (eixo y) de IgG (A), IgM (B) e IgA (C) no soro de pacientes com esporotricose. A linha tracejada mostra o intervalo de confiança 95% para a regressão linear (linha contínua) dos valores obtidos nos experimentos.

Reações cruzadas

Para estudar reatividade de anticorpos IgG, IgM e IgA contra os exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* presentes nos soros de pacientes com outras doenças infecciosas, e de indivíduos saudáveis, foram incluídos 94 soros neste estudo e suas reatividades estão demonstradas na figura 11. Reações cruzadas foram mais frequentes com anticorpos da classe IgM que com os demais. Um total de 21 soros (22,34% do total de soros heterólogos e controles negativos) apresentou reatividade para IgM nos ELISAs realizados. Destes, 2 soros foram obtidos de pacientes com histoplasmose (n=13; 15%), 3 de pacientes com tuberculose (n=12; 25%), 9 de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (n=18; 50%), um de paciente com aspergilose (n=4; 25%), um de paciente com paracoccidiodomicose (n=12, 8%) e 5 de indivíduos sadios (n=26, 19%). Nenhum dos soros de pacientes com criptococose apresentou reatividade para IgM, assim como para IgG.

Reatividade cruzada foi observada em 11 soros testados para detecção de IgG contra exoantígenos de *S. schenckii*, sendo 3 provenientes de pacientes com histoplasmose (n=13, 23%), 2 de pacientes com tuberculose (n=12, 17%), 3 de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (n=18, 17%), um de paciente com aspergilose (n=4, 25%), um de paciente com paracoccidiodomicose (n=12, 8%) e um de um indivíduo saudável, doador de sangue (n=26, 4%).

Oito soros apresentaram reatividade para IgA nos ensaios realizados. As doenças que apresentaram reações positivas foram histoplasmose (3 de 13 soros, 23%), leishmaniose tegumentar americana (2 de 18 soros, 11%), paracoccidiodomicose (2 de 12 soros, 17%) e criptococose (1 de 9 soros, 11%). Nenhum paciente com tuberculose ou aspergilose apresentou resultado positivo na pesquisa de IgA.

Embora reatividade cruzada tenha sido observada, a média de densidades óticas para cada doença estudada foi estatisticamente menor que a média das leituras dos soros de pacientes com esporotricose antes do início do tratamento antifúngico (Tabela 4).

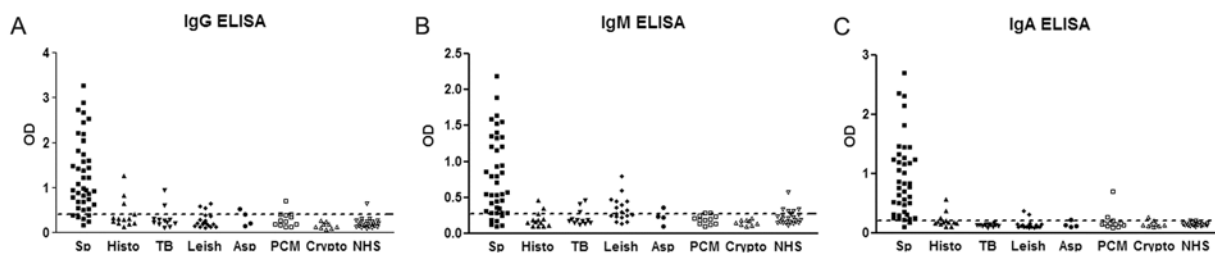


Figura 11: Reações cruzadas observadas nas reações imunoenzimáticas para detecção de IgG (A), IgM (B) e IgA (C) contra exoantígenos de forma filamentosa de *S. schenckii*. Este estudo foi realizado com 94 soros de pacientes com histoplasmose (Histo), tuberculose (TB), leishmaniose tegumentar americana (Leish), aspergilose (Asp), paracoccidiodomicose (PCM), criptococose (Crypto) e indivíduos sadios (NHS). As linhas tracejadas simbolizam o ponto de corte de cada reação. Amostras acima deste ponto de corte foram consideradas positivas.

Tabela 4: Médias e desvios padrões das leituras de densidade ótica dos diferentes grupos na pesquisa de IgG, IgM e IgA contra exoantígenos de *S. schenckii*.

<i>Grupo de pacientes</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>IgA</i>
Esporotricose	1,282 ± 0,8173	0,7945 ± 0,5497	0,9261 ± 0,6541
Paracoccidiodomicose	0,3042 ± 0,1687	0,1974 ± 0,06256	0,2062 ± 0,1637
Criptococose	0,1649 ± 0,06879	0,1557 ± 0,03766	0,1578 ± 0,05370
Aspergilose	0,3255 ± 0,1759	0,2351 ± 0,1068	0,1448 ± 0,05316
Histoplasmose	0,4161 ± 0,3214	0,1978 ± 0,1071	0,2182 ± 0,1251
Tuberculose	0,3227 ± 0,2362	0,2237 ± 0,1090	0,1362 ± 0,02107
Leishmaniose	0,2809 ± 0,1677	0,3412 ± 0,1685	0,1469 ± 0,07717
Indivíduos normais	0,2112 ± 1067	0,2254 ± 0,09806	0,1531 ± 0,02630

Comparação entre detecção de diferentes isotipos de anticorpos

Para comparar os três ensaios imunoenzimáticos realizados para pesquisa dos três diferentes isotipos de imunoglobulinas curvas ROC foram construídas utilizando as densidades óticas dos soros de pacientes com esporotricose antes do início da terapia antifúngica bem como soros de pacientes com outras doenças infecciosas e os controles negativos. Na tabela 4 verificamos que a área sob a curva da detecção de IgA foi maior que a da detecção de IgG, que foi maior que a de detecção de IgM (IgA>IgG>IgM). De acordo com a classificação proposta por Greiner e seus colaboradores (2000), os valores apresentados na Tabela 5 permitem classificar a detecção de anticorpos da classe IgG e IgA através da técnica de ELISA indireto com exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* como tendo excelente acurácia e a detecção de IgM como tendo acurácia moderada.

Tabela 5: Análise estatística das áreas sob as curvas ROC na pesquisa de IgG, IgM e IgA na esporotricose.

Anticorpo detectado	Área	Erro padrão	Intervalo de confiança 95%	
			Valor inferior	Valor superior
IgG	0,936	0,023	0,890	0,982
IgM	0,856	0,042	0,774	0,939
IgA	0,957	0,022	0,913	1,001

Também foram comparadas as densidades óticas dos diferentes isotipos nos diferentes pacientes para verificar se existe correlação entre os níveis de anticorpos de diferentes isotipos num mesmo paciente com esporotricose, antes do início do tratamento antifúngico. Os resultados desta análise podem ser observados na Figura 12. Em todas as comparações foram verificadas correlações positivas (IgG e IgM, $r=0,530$; IgG e IgA, $r=0,671$; IgM e IgA, $r=0,589$). ANOVA mostrou correlação em todas as análises ($P<0,05$ em todos os casos).

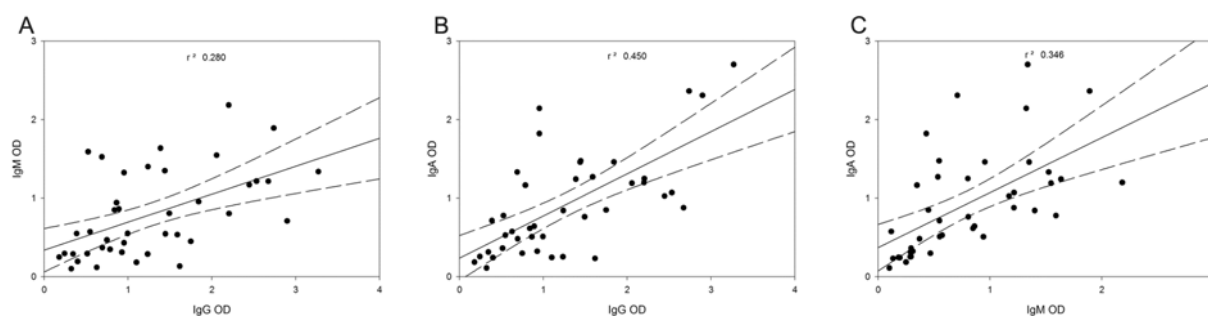


Figura 12: Correlação entre os níveis de anticorpos de diferentes isotipos em pacientes com esporotricose. Valores de densidade ótica (OD) de um dado isotipo foram plotados contra valores de densidade ótica de outro isotipo. A linha de regressão linear (contínua) no meio é circundada por duas linhas tracejadas que representam o intervalo de confiança 95%. Valores de r^2 foram calculados para cada comparação usando o programa SigmaPlot 2000. A: comparação entre os níveis de IgG e IgM. B: comparação entre os níveis de IgG e IgA. C: comparação entre os níveis de IgM e IgA.

Aplicabilidade da detecção de diferentes isotipos no sorodiagnóstico da esporotricose

A Tabela 6 apresenta os parâmetros sorológicos obtidos para cada ELISA realizada durante o estudo da resposta imune humoral nos pacientes com esporotricose. Como sugerido pela análise de curvas ROC, os melhores resultados foram obtidos quando anticorpos da classe IgA foram pesquisados, com uma sensibilidade de 95,1%, especificidade de 91,5% e eficiência de 92,6%.

Tabela 6: Parâmetros sorológicos dos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgG, IgM e IgA contra os exoantígenos de *S. schenckii* no diagnóstico imunológico da esporotricose.

Parâmetro	Valores para a detecção de		
	IgG	IgM	IgA
Sensibilidade	85,4%	85,4%	95,1%
Especificidade	87,2%	77,7%	91,5%
Eficiência	87,4%	80,0%	92,6%
Valor preditivo positivo	76,1%	62,5%	83,0%
Valor preditivo negativo	93,3%	92,4%	97,7%
Razão de probabilidade positiva	7,2949	3,8211	11,1768
Razão de probabilidade negativa	0,1657	0,1884	0,0533

Para verificar se a combinação de resultados de dois ou três diferentes ensaios de pesquisa de diferentes isotipos de imunoglobulinas poderia aumentar a sensibilidade ou a especificidade da técnica padronizada, foram realizados os mesmos cálculos dos parâmetros sorológicos considerando como positiva uma amostra de soro com resultados positivos para IgG e IgM, IgG e IgA, IgM e IgA, nos três isotipos testados ou em quaisquer dois dos três

isotipos analisados neste estudo. Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 7. Foi observado um aumento geral da especificidade em todos os casos, devido ao fato de que, dos soros que apresentaram reatividade cruzada com os exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii*, a maioria deles (23 de 31 soros com reatividade cruzada, 74,2%) o fez em apenas um isotipo de imunoglobulina. O melhor cenário para o diagnóstico sorológico da esporotricose foi obtido quando uma amostra de soro foi considerada positiva quando apresentou reatividade em pelo menos dois dos três isotipos de anticorpos pesquisados. Neste caso o ensaio obteve 92,7% de sensibilidade, 91,5% de especificidade e uma eficiência de 91,9%.

Tabela 7: Combinação do resultado de diferentes ELISAs no sorodiagnóstico da esporotricose.

Isotipos	Sensibilidade	Especificidade	Eficiência	VPP ^a	VPN ^b
IgG e IgM positivos	78,0%	95,7%	90,4%	88,9%	90,9%
IgG e IgA positivos	85,4%	97,9%	94,1%	94,6%	93,9%
IgM e IgA positivos	85,4%	95,7%	92,6%	89,7%	93,8%
Dois isotipos positivos	92,7%	91,5%	91,9%	82,6%	96,6%
IgG, IgM e IgA positivos	78,0%	98,9%	92,6%	97,0%	91,2%

^a VPP = valor preditivo positivo

^b VPN = valor preditivo negativo

Caracterização de proteínas antigênicas

Em uma tentativa de caracterizar uma possível proteína que estivesse relacionada à reatividade observada em nossos ensaios imunoenzimáticos, realizamos uma separação das proteínas deste extrato por SDS-PAGE, analisando em seguida a reatividade dessas proteínas frente a soros de pacientes com esporotricose, com outras doenças infecciosas e de indivíduos saudáveis. A figura 13 apresenta o resultado da técnica de imunoblot realizada após eletroforese do exoantígeno da forma filamentosa do isolado 23508 de *S. schenckii*. Tiras contendo as proteínas do antígeno separadas de acordo com seu peso molecular foram incubadas com uma mistura de soros de pacientes com esporotricose (tira 1), mistura de soros de pacientes com diferentes doenças infecciosas, a saber as mesmas testadas para reação cruzada nos ELISAs (tira 2) e com uma mistura de soros de indivíduos doadores de sangue, saudáveis (tira 3). Conforme verifica-se na figura, a maioria das proteínas de alto peso molecular apresentou reatividade cruzada e as proteínas de baixo peso molecular mostraram ser espécie-específicas.

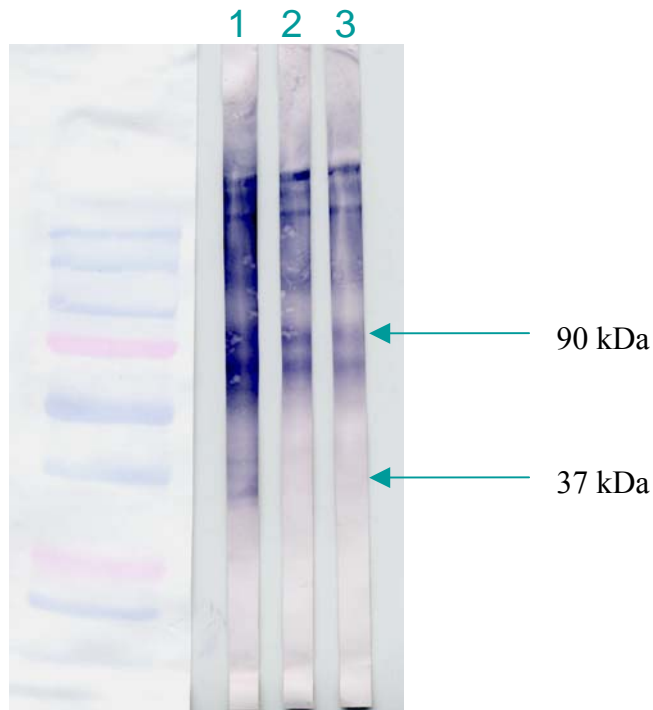


Figura 13: Reação de imunoblot utilizando exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* quando testados contra uma mistura de 41 soros de pacientes com esporotricose (tira 1), 48 soros de pacientes com doenças infecciosas diversas como histoplasmose, paracoccidioidomicose, leishmaniose, aspergilose, tuberculose e criptococose (tira 2) e 26 soros de indivíduos saudáveis com sorologia negativa para HIV, Hepatite B, VDRL e doença de Chagas (tira 3). À esquerda temos o marcador de peso molecular pré-corado. As setas indicam as proteínas de 90 e 37 kDa selecionadas para caracterização por MALDI-TOF-MS.

Para caracterização proteica foram então selecionadas duas proteínas deste extrato: uma proteína espécie-específica, de 37 kDa, e uma proteína que apresenta reatividade cruzada com soros heterólogos, de 90 kDa. Como controles negativos foram selecionadas áreas diferentes do gel de poliacrilamida que não possuíam bandas proteicas coradas pelo Coomassie Blue. Análise por MALDI-TOF-MS dos controles negativos não revelou nenhum peptídeo. Surpreendentemente, os peptídeos isolados das duas proteínas analisadas foram caracterizados como sendo os mesmos nas duas diferentes amostras. Os seis peptídeos isolados apresentaram homologia com a proteína STB2 de *S. cerevisiae* quando feita busca por meio da ferramenta BLASTp (Figura 14). Esta proteína interage com a proteína Sin3p e outras num complexo proteico que possui atividade enzimática de histona desacetilase. A proteína STB2 em *S. cerevisiae* apresenta peso molecular de 97 kDa e quando analisada com o programa Protean Lasergene 7.0 (DNASTAR Inc.) apresenta várias regiões de grande hidrofobicidade e alto índice antigênico (Figura 15).


```

1  MVMADTIATG DKTSQFDGKH MQDLERIYST RDTLDDNFFG ERGQKDANGD
51  YYDELNNEET NYSGSSYYGH SDDSEVVGLI KNDTVSQLPP LDSFIFPDSR
101 ALFLLDLGNY ADLTYEEIIV HGFEEIYIVEQ WVACRNLSTL ITSYTGNSQD
151 TISGVRVVLP KDTSMWPGRF RLYFEELMEF ARPKFTPPKGT LFITNLSGVS
201 FGLNLLHVEC GDLRTIWKDF EVNFDLKNLH CGGRSANLLC PPTMASLDKF
251 SQLFKIPTNG FIAQYPQMIQ QQQPRLLPEEE YKTVGNSKCR NTDSKSPVVE
301 MVTLIQISLS YFNLLSKNYQ TDGLLCEDTK RAIDEWWETY GKLYLGTEKP
351 RNECTLGPTT VAGLISLILC CYFKLMIENC ISSKDPFDEA GFFQGIYNFQ
401 KKHGLNKRKS RYVLDPRTLE KLF EVTAKVS SKDIFKLKKM VTSTVQDIIG
451 KGNPINLSHK ILTTDLDTLI HNIHGGSVGL LWKKGKGHPRK CCTDISNEEF
501 LKFNYQRGDP DGQIREREML LEKFRLERIA YAQKHASKKV SSSSLDTSED
551 IGRTNAMPSS ATVSSMFPNY DNTKYAYNFG INKLYQGEYY RRNSFPYCKD
601 RTHDNIYEDL SELKEKSSRL YRCNSSSAVQ NIVEKWDLPF DPSVVRIARD
651 LLRMKYDIQA QQHIQEMDEH YMGKLNKEGT VGQYSKFNER YKRLQELYKK
701 YSDGAKVFEG RFEDIDNKQQ LLLHEMQELN SLSSRLKYDM RILEVRVRDI
751 ESSVAQFDSK LIGLKSSLQG QGKTGICSAI DPKSDKDEYD RCVNDLMTTN
801 NPTYEALCLK MLSRRYFKDL KNDTVGWFRW LFGNNSLHNN ASEDDRGIRV

```

Figura 14: Seqüência peptídica da proteína STB2 de *Saccharomyces cerevisiae*, a qual participa de um complexo enzimático com atividade biológica de histona desacetilase. A proteína apresenta 850 aminoácidos e um peso molecular de 97 kDa. Peptídeos marcados em vermelho foram os peptídeos isolados das duas proteínas de 90 e 37 kDa presentes nos exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii*.

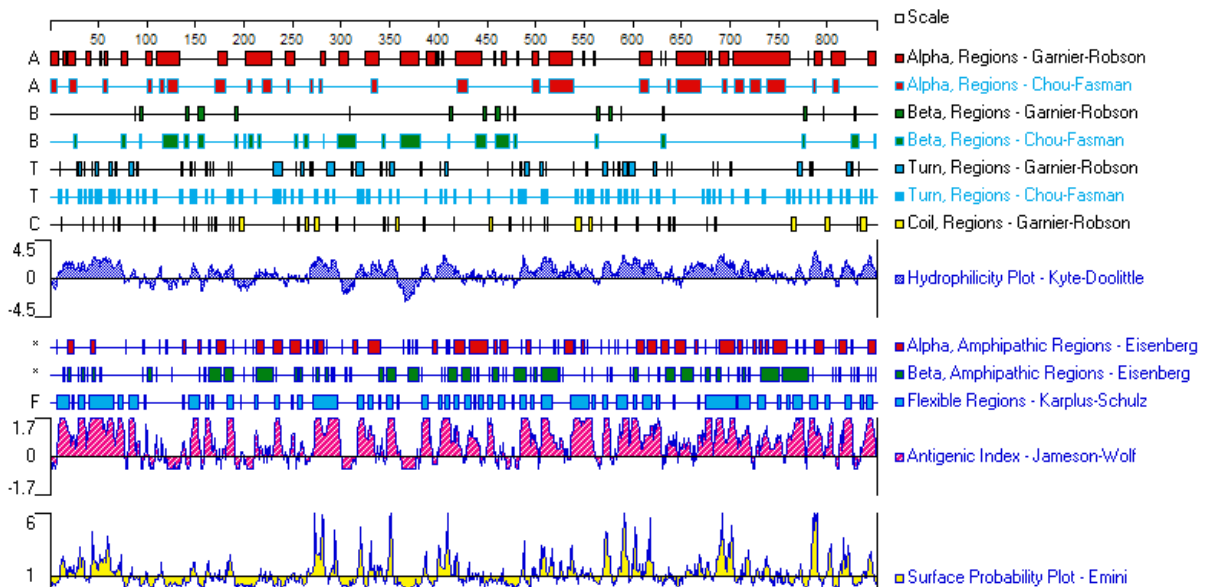


Figura 15: Análise computacional da proteína STB2 de *S. cerevisiae* utilizando o programa Protean 7.0 (DNASTAR, Inc.). Importante verificar que a proteína apresenta alto índice antigênico (gráfico na cor rosa da figura) em regiões hidrofílicas (gráfico azul escuro da figura) e flexíveis (gráfico com barras azuis claras da figura). Todos estes fatores contribuem para a predição de um epítipo B linear.

A fim de tentar entender as reações cruzadas que ocorrem quando se utilizam os exoantígenos de *S. schenckii* na técnica de ELISA, foi feita uma busca de similaridade dos peptídeos isolados com proteínas dos agentes das doenças estudadas neste trabalho. Interessantemente, foi verificado que um dos peptídeos apresentava alta homologia com uma proteína hipotética de *Leishmania major* (Figura 16).

```

unk|VIRT8214|Blast_submission      SANLLCPPTMASLDK
sp|P46679|STB2_YEAST                SANLLCPPTMASLDK
tr|Q4Q9W5|Q4Q9W5_LEIMA             LAALACPPSLASLDK
                                     * * ***:;*****

```

Figura 16: Busca utilizando o algoritmo BLASTp de proteínas dos agentes etiológicos das doenças que apresentaram reatividade cruzada nos ensaios imunoenzimáticos realizados neste estudo. Verificou-se que um dos peptídeos obtidos das proteínas presentes na mistura antigênica utilizada em todo o decorrer deste trabalho (primeira linha) apresenta alta homologia com uma proteína de *L. major* (terceira linha). Na segunda linha temos o mesmo peptídeo na proteína STB2 de *S. cerevisiae*. Abaixo dos peptídeos temos símbolos que representam o grau de semelhança entre os aminoácidos. * simboliza identidade total e : simboliza aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Discussão

A esporotricose é uma doença cosmopolita, sendo considerada a micose subcutânea de maior prevalência na América Latina (Conti-Diaz, 1989). O padrão ouro no diagnóstico desta doença infecciosa é o isolamento do seu agente etiológico em cultivo micológico, entretanto longo tempo é necessário desde a coleta e o processamento do material clínico, o crescimento do fungo nos meios de cultura e a realização de todas as análises necessárias para a sua correta identificação (Dixon *et al.*, 1991). Todos estes procedimentos podem levar até três semanas. Além disso, em casos de esporotricose extracutânea, a coleta de material clínico adequado para o isolamento do fungo em cultivo é extremamente difícil, necessitando de procedimentos invasivos para sua realização, e em alguns casos é mesmo impossível de ser realizada. A obtenção de material clínico para o diagnóstico também não pode ser realizada em casos de regressão espontânea das lesões.

Recentemente, no Estado do Rio de Janeiro, deu-se início a uma epidemia de esporotricose, envolvendo diversos municípios, onde o fungo vêm sendo transmitido aos humanos não pela forma clássica de contaminação desta doença, ou seja, através de plantas, madeiras ou solo contaminado (Rippon, 1988), mas através da arranhadura, mordedura ou contato com gatos domésticos infectados por *S. schenckii* (Barros *et al.*, 2001). Esta forma de veiculação da doença tem acarretado em manifestações clínicas pouco comuns da esporotricose, tal como o acometimento primário da mucosa nasal (Schubach *et al.*, 2003), eritema nodoso (Gutierrez-Galhardo *et al.*, 2002), eritema multiforme (Gutierrez-Galhardo *et al.*, 2005), conjuntivite primária (Schubach *et al.*, 2005c) e elevado número de casos de esporotricose cutânea disseminada, uma forma clínica menos comum da doença (Barros *et al.*, 2003). Como consequência destes fatos, o desenvolvimento de técnicas imunológicas baseadas na detecção de anticorpos do hospedeiro ou antígenos fúngicos é altamente importante e necessário, tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento terapêutico da infecção.

A detecção de anticorpos no soro de pacientes com esporotricose vêm sendo realizada a muitos anos através de técnicas imunológicas que envolvem precipitação ou aglutinação de complexos antígeno-anticorpo (Karlin & Nielsen, 1970; Blumer *et al.*, 1973; Ishizaki *et al.*, 1978; Smith *et al.*, 1981; Casserone *et al.*, 1983; Albornoz *et al.*, 1984; Mendoza *et al.*, 2002). Limitações destas técnicas incluem sua baixa sensibilidade em casos de esporotricose cutânea (Albornoz *et al.*, 1984; Rippon, 1988) e o fato de não ser possível determinar os diferentes isotipos de anticorpos que estão participando da resposta imune humoral contra *S. schenckii*.

Os testes imunoenzimáticos constituem uma solução interessante a este problema, visto que eles possuem em geral um limiar de detecção maior que os métodos de aglutinação e conseqüentemente uma sensibilidade mais elevada.

Na literatura médica especializada há uma imensa variedade de ensaios imunoenzimáticos descritos para o diagnóstico de infecções causadas por diversos fungos dimórficos, como histoplasmose, paracoccidiodomicose e peniciliose marnefei (Mendes-Giannini *et al.*, 1984; Hammilton, 1998; Pizzini *et al.*, 1999; Valle *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2004; Albuquerque *et al.*, 2005). Entretanto, no nosso conhecimento, para o diagnóstico imunológico da esporotricose, até o ano de 2006 havia somente duas publicações descrevendo o uso de técnicas imunoenzimáticas no sorodiagnóstico da esporotricose, ambas focando somente a pesquisa de anticorpos da classe IgG (Scott & Muchmore, 1989; Bernardes-Engemann *et al.*, 2005). Também o primeiro estudo realizado por nosso grupo neste sentido foi acerca da pesquisa de IgG no soro de pacientes com esporotricose (Almeida-Paes *et al.*, 2007). Desta forma, o trabalho aqui descrito é o primeiro a demonstrar a participação de anticorpos da classe IgM e IgA na patogenia da esporotricose humana. Este é um achado importante, visto que anticorpos de diferentes isotipos podem participar da linha de defesa do hospedeiro contra fungos patogênicos (Nosanchuk *et al.*, 2005; Chaturvedi *et al.*, 2005; Rivera & Casadevall, 2005) e situação semelhante poderia ocorrer na esporotricose. Além disso, outros fatores que nos impeliram a estudar os diferentes isotipos de anticorpos na esporotricose foram dados de infecção experimental em camundongos que sugerem a participação de anticorpos de diferentes isotipos na resposta imune humoral (Nascimento & Almeida, 2005). Outro aspecto é o fato de que, como ocorre com outros fungos, muitos indivíduos residentes em áreas endêmicas não desenvolvem a doença, mas acabam desenvolvendo uma resposta imune humoral específica (Esterre *et al.*, 1997; Baida *et al.*, 1999), cenário que pode estar ocorrendo no Rio de Janeiro.

A técnica de ELISA recentemente publicada para o diagnóstico imunológico da esporotricose (Bernardes-Engemann *et al.*, 2005) utiliza uma preparação antigênica purificada da parede celular, denominada SsCBF, preparada através de cromatografia de afinidade em coluna com concanavalina A, a qual se pressupõe que possam ocorrer menos variações a cada lote antigênico produzido. O antígeno utilizado no ensaio imunoenzimático descrito neste trabalho possui uma coleção de proteínas altamente reativas como demonstrado na técnica de imunoblot e é obtido com bastante facilidade, não necessitando de equipamentos nem de técnicas de purificação sofisticadas, tais como as cromatográficas, e pode ser utilizado especialmente nos laboratórios de áreas com recursos financeiros limitados, sendo assim uma nova ferramenta para o diagnóstico desta doença fúngica.

O método de ELISA padronizado por nós utilizando os exoantígenos estudados apresentou 97% de sensibilidade na detecção de IgG. Anticorpos anti-*S. schenckii* foram detectados na maioria das amostras de soro de pacientes com diferentes formas clínicas da esporotricose apresentando valores de densidade ótica maiores que o ponto de corte, muitos deles inclusive com altos valores de leitura de absorbância, indicando que este teste pode ser utilizado no diagnóstico das mais diversas formas clínicas da esporotricose. A média das absorbâncias observadas nos soros de pacientes com diferentes formas clínicas não apresentou diferença estatisticamente significativa, dado também observado por Bernardes-Engemann e seus colaboradores (2005). Esta verificação não é observada por exemplo, na cromoblastomicose, uma micose subcutânea tal qual a esporotricose, onde os pacientes com múltiplas lesões apresentam títulos de anticorpos da classe IgG mais elevados que os pacientes com uma lesão única (Esterre *et al.*, 2000). Embora aparentemente a resposta imune humoral possa participar no controle e na prevenção da esporotricose (Nascimento & Almeida, 2005), os títulos de anticorpos específicos contra *S. schenckii* não parecem estar relacionados à gravidade da doença, já que os pacientes com uma lesão cutânea fixa possuem títulos de anticorpos extrapolados pelos valores de densidade ótica similares aos valores obtidos de pacientes com múltiplas lesões.

Verificou-se também que não somente anticorpos da classe IgG apresentam reatividade cruzada contra antígenos de *S. schenckii*, mas também os da classe IgM e IgA. Observou-se também que em 33% de indivíduos sem esporotricose confirmada pelo isolamento do fungo em cultivo anticorpos anti-*S. schenckii* de pelo menos um isotipo nas técnicas de ELISA empregadas no estudo foram encontrados. Destes pacientes com reatividade cruzada, 74,2% apresentaram somente um isotipo positivo nas reações imunoenzimáticas. Esta reatividade provavelmente se deve a similaridade entre os antígenos de *S. schenckii* e os de outras espécies microbianas, ao invés de contato prévio com *S. schenckii*, já que somente 2,56% dos pacientes com esporotricose comprovada testados para os três isotipos apresentaram somente níveis detectáveis de uma única classe de anticorpos. Mesmo durante o tratamento, a maioria dos pacientes com esporotricose mantém reatividade imunológica em mais de um isotipo de imunoglobulina. Entretanto, para os demais 25,8% dos pacientes sem esporotricose confirmada micologicamente com resultados positivos, em especial um paciente com histoplasmose, que apresentou reatividade nos três isotipos de imunoglobulina testados, contato prévio com *S. schenckii* não pode ser descartado, já que estes pacientes moram em uma área endêmica de esporotricose.

A esporotricose cutânea e a leishmaniose tegumentar americana apresentam várias características clínicas e epidemiológicas semelhantes, e muitos pacientes com esporotricose

relatam que a doença iniciou como uma picada de mosquito, o que pode levar a um diagnóstico errôneo por parte dos clínicos, especialmente aqueles que não dispõem de condições laboratoriais adequadas para um diagnóstico correto (Lober *et al.*, 1980). Complicando ainda mais este cenário, um estudo recente mostrou que 48% dos pacientes com esporotricose reagem positivamente no teste intradérmico de Montenegro, e 23% destes também são positivos na técnica de ELISA para leishmaniose, ainda que não tenha sido isolada qualquer espécie de *Leishmania* em cultivo (Barros *et al.*, 2005). Embora co-infecção por *S. schenckii* e *Leishmania* possa acontecer (Agudelo *et al.*, 1999) este é um achado incomum, já que as duas doenças apresentam vias de transmissão totalmente distintas. Em nossos estudos verificamos uma série de reações positivas em soros de pacientes com leishmaniose contra antígenos de *S. schenckii* nos diversos isotipos estudados (17%, 50% e 11% para IgG, IgM e IgA, respectivamente), mostrando que a reatividade cruzada entre *Leishmania* e *S. schenckii* é evidente. Para corroborar este achado, verificamos que um dos peptídeos obtidos após digestão enzimática de duas proteínas antigênicas de *S. schenckii* presentes na amostra antigênica usada em nossos ELISAs apresentava alto grau de homologia com uma proteína hipotética de *L. major*, reforçando, com isso, a hipótese que proteínas dessas duas espécies compartilham determinantes antigênicos comuns. Portanto, se faz necessário identificar antígenos específicos que permitam o diagnóstico diferencial entre essas duas doenças infecciosas, uma vez que um diagnóstico incorreto poderia levar a instauração de um regime terapêutico ineficaz ao paciente.

Quando estudamos os diferentes isotipos de imunoglobulinas produzidas na infecção natural humana por *S. schenckii*, verificamos que a maioria dos pacientes com esporotricose apresentaram níveis detectáveis de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA contra os exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* no momento do diagnóstico clínico, ou seja, antes do início do tratamento antifúngico. Esta reatividade permaneceu em pacientes em tratamento com itraconazol, com uma tendência de diminuição dos níveis de anticorpos à medida que o tempo de terapia antifúngica se prolonga. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato de anticorpos IgM e IgA na esporotricose humana. Essas duas classes de anticorpos podem ter participação importante na patogenia da esporotricose. Já foi demonstrado que *S. schenckii* é capaz de ativar o sistema complemento pela via alternada, e que a ativação da via clássica também possa ocorrer (Scott *et al.*, 1986). Os anticorpos da classe IgM podem ter um papel na ativação do sistema complemento pela via clássica na esporotricose, o que já foi demonstrado em outras micoses (Kozel, 1996). Envolvimento de mucosas pode ocorrer na esporotricose (Castro *et al.*, 1981; Hampton *et al.*, 2002; Barros *et*

al., 2003; Schubach *et al.*, 2003; Schubach *et al.*, 2005c; Lopes-Bezerra *et al.*, 2006) e nesse contexto, anticorpos IgA podem representar um importante mecanismo de defesa.

É importante observar que neste estudo, foi verificado que anticorpos IgM e IgA permaneceram com níveis detectáveis na maioria dos pacientes em tratamento para esporotricose fazendo uso de itraconazol, embora seus níveis tenham variado dependendo da forma clínica do paciente. Pacientes em uso de itraconazol com as formas cutânea fixa e linfocutânea de esporotricose apresentaram títulos de anticorpos extrapolados pelos valores de densidade ótica estatisticamente inferiores aos pacientes sem tratamento. Entretanto, não foi observada diferença significativa nos níveis desses anticorpos em pacientes com as formas cutâneo-disseminada e extracutânea da esporotricose, antes e durante o tratamento. Possivelmente isso se deve a uma maior carga parasitária nestes últimos pacientes, o que levaria a uma estimulação antigênica contínua e constante produção de anticorpos, em especial os da classe IgM. Anticorpos da classe IgG não tiveram seus níveis estatisticamente diminuídos em pacientes em tratamento contra a esporotricose, em comparação com os pacientes sem tratamento. Esta observação pode ser explicada pela elevada meia vida deste isotipo de imunoglobulina. Entretanto, verificando o comportamento dos níveis de anticorpos específicos nos pacientes em tratamento, com respeito ao tempo de terapia antifúngica, verificamos que IgG e IgM apresentam uma diminuição de seus níveis de acordo com o tempo, sugerindo com isso que esses isotipos podem ser utilizados como marcadores para o acompanhamento da terapia antifúngica na esporotricose. Como as formas cutâneo-disseminada e extracutânea são formas menos comuns de esporotricose, a amostragem de soros de pacientes com estas formas clínicas em tratamento incluída no estudo foi reduzida, portanto são necessários novos estudos com um número maior de soros para validar esta hipótese.

A medida da performance da ELISA padronizada para uso no diagnóstico da esporotricose através da curva ROC mostra uma diferença estatisticamente significativa entre as absorbâncias médias observadas nos soros de pacientes com esporotricose e naquelas observadas nos controles humanos saudáveis bem como nos soros de pacientes heterólogos. Por outro lado, a absorbância média dos soros heterólogos foi estatisticamente maior que a média encontrada no grupo de controles negativos. Sugere-se que os antígenos de *S. schenckii* sejam, em sua maioria, glicoproteínas apresentando alto grau de glicosilação, sobretudo com os carboidratos manose, ramnomanose e galactose (Takata & Ishizaki, 1983; Lopes-Bezerra *et al.*, 2006) e que porções glicosídicas dos antígenos fúngicos são responsáveis por elevado grau de reações cruzadas em outras micoses (Wheat *et al.*, 1986, Zancopé-Oliveira *et al.*, 1994). De fato, reações cruzadas entre *S. schenckii* e diversos fungos patogênicos tais como *Exophiala*

verneckii, *Fonsecaea pedrosoi*, *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *A. fumigatus* e *Trichophyton mentagrophytes* foram descritas devido aos epítomos glicosilados presentes nos antígenos destes fungos (Ishizaki *et al.*, 1981). Reações cruzadas entre *S. schenckii* e fungos ambientais (Ishikazi *et al.*, 1976; Polonelli & Morace, 1982) e entre espécies bacterianas, como *Streptococcus* do grupo B (Nakamura *et al.*, 1977) e *Klebsiella pneumoniae* (Takata & Ishizaki, 1983) também já foram descritas. O reconhecimento não específico de epítomos glicosilados pode explicar as reações cruzadas observadas nos ELISAs realizados neste estudo, bem como a diferença estatística entre os soros heterólogos e os soros de indivíduos sadios. Paralelamente, não se pode descartar a possibilidade de exposição prévia dos indivíduos com falsa soropositividade ao fungo *S. schenckii*, visto que todos os soros foram colhidos de habitantes de uma área onde a esporotricose é endêmica (Barros *et al.*, 2004, Lopes-Bezerra *et al.*, 2006). A glicosilação dos antígenos de *S. schenckii* também explica a produção de anticorpos da classe IgM contra este fungo, já que antígenos de origem glicídica evocam a produção deste isotipo de imunoglobulina.

Nossos ensaios imunoenzimáticos foram realizados com uma preparação antigênica não purificada. Quando um extrato antigênico não purificado de *P. brasiliensis* foi utilizado na padronização de uma técnica de ELISA, reações cruzadas foram observadas com soro de pacientes com outras micoses, como histoplasmose, lobomicose, criptococose, candidíase e esporotricose, reações estas que puderam ser eliminadas com a incubação do soro com antígenos de *H. capsulatum* antes dos ensaios imunoenzimáticos (Mendes-Giannini *et al.*, 1984). Em nossos ensaios também observamos reações cruzadas com diversas doenças infecciosas, o que também ocorreu no ELISA recentemente padronizado por Bernardes-Engemann e colaboradores (2005). Para reduzir a reatividade cruzada de soros contra antígenos de *S. schenckii* um método de adsorção poderia ser aplicado aos soros antes da sua aplicação na técnica de ELISA. Outra estratégia que poderia ser utilizada é a deglicosilação de antígenos de *S. schenckii*, como é atualmente realizado no sorodiagnóstico da histoplasmose, o que aumenta a especificidade do ensaio (Pizzini *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2004). Estudos neste sentido estão sendo conduzidos em nosso laboratório para verificar se estas hipóteses podem ser aplicadas nos métodos sorológicos empregados no diagnóstico da esporotricose.

Neste trabalho foram utilizadas duas abordagens para cálculo e determinação do ponto de corte. Na padronização da pesquisa de IgG nos soros de pacientes com esporotricose foi utilizado para essa finalidade o valor obtido através da média de leitura dos soros normais adicionada de três vezes o valor do desvio padrão destes soros, como é realizado na sorologia de outras micoses (Guimarães *et al.*, 2004). Esta abordagem foi escolhida inicialmente porque queríamos determinar um ponto de corte que permitisse a diminuição máxima de resultados

falso-positivos neste teste com finalidades diagnósticas. Já nos experimentos para pesquisa dos diferentes isotipos de imunoglobulinas produzidas durante a infecção demos preferência a escolher uma metodologia estatística que permitisse a detecção de um ponto de corte ótimo, independente do número de falso negativos ou positivos (Greiner *et al.*, 1995), já que a abordagem inicial neste experimento não era diagnóstica. Entretanto, mesmo assim foi verificado que a detecção conjunta dos diferentes isotipos de imunoglobulinas pode aumentar a especificidade no sorodiagnóstico da esporotricose. Estudos estão atualmente em andamento para validar esta abordagem.

O diagnóstico sorológico da esporotricose é um problema, especialmente em termos de especificidade (Bernardes-Engemann *et al.*, 2005; Almeida-Paes *et al.*, 2007). O número cada vez mais crescente desta doença, juntamente com os casos complicados que podem acontecer em pacientes imunocomprometidos (Hardman *et al.*, 2005) impelem a uma busca por metodologias diagnósticas cada vez melhores. Quando padronizamos a técnica de ELISA para o diagnóstico da esporotricose verificamos um valor de sensibilidade maior que o observado quando testamos os soros para IgG no contexto da análise de isotipos de anticorpos produzidos no decorrer da infecção. Esta diferença pode ter ocorrido pelas pequenas mudanças inseridas no protocolo do segundo experimento, realizadas para permitir a detecção de IgM e IgA nos soros dos pacientes. Outro fator que pode ter contribuído para a diminuição do valor de sensibilidade pode ter sido o fato dos soros terem sido colhidos de pacientes distintos nos dois estudos. Como todos os soros foram selecionados randomicamente, alguns deles podem ter sido colhidos em momentos iniciais da doença, antes da produção de anticorpos específicos se iniciar. De fato, para dar suporte a esta hipótese, foi verificado que na infecção experimental de *S. schenckii* em camundongos, a resposta imune humoral é montada em estágios avançados da infecção, normalmente após a quinta semana (Maia *et al.*, 2006). Outra observação que sugere coleta de soro antes do início da produção de IgG é que 3 dos pacientes com níveis não detectáveis desta imunoglobulina apresentaram IgM positiva no soro. Entretanto, a área da curva ROC obtida nos dois estudos apresentou valores superiores a 0.9, indicando que a detecção de IgG específica contra exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* é um teste com excelente acurácia no diagnóstico sorológico da esporotricose.

No contexto da detecção de diferentes isotipos na esporotricose, verificou-se valores de especificidade variando de 77,7% a 91,5%, dependendo do isotipo detectado no soro. Todavia, quando os resultados dos diferentes ELISAs são combinados, um grande aumento na especificidade é verificado, particularmente quando se considera positiva uma amostra de soro que possua pelo menos dois isotipos reativos contra os antígenos de *S. schenckii* testados. Isso é bastante significativo, já que não há kits sorológicos comercialmente disponíveis para o

diagnóstico desta micose e testes específicos são extremamente necessários. Embora testes sorológicos não forneçam diagnóstico definitivo, eles são ferramentas importantes no diagnóstico das infecções. Assim sendo, os resultados dos testes sorológicos devem ser interpretados de acordo com achados clínicos e história epidemiológica dos pacientes.

Paralelamente ao desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da esporotricose nosso grupo iniciou a caracterização das proteínas com atividade antigênica do fungo, uma vez que a composição antigênica de *S. schenckii* é pouco conhecida e há poucos antígenos descritos, fato que dificulta o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos sensíveis e específicos, sobretudo aqueles baseados na detecção de antígenos fúngicos. Mendoza e colaboradores (2002) descreveram a composição antigênica de exoantígenos de forma filamentosa de *S. schenckii* e mostraram que estes exoantígenos obtidos em meio Sabouraud líquido não apresentava reatividade cruzada na técnica de imunodifusão radial dupla em gel de agar com uma amostra de soro de paciente com coccidioidomicose, uma amostra de soro de paciente com histoplasmose e uma amostra de soro de paciente com paracoccidioidomicose. Esses mesmos exoantígenos também foram utilizados previamente com sucesso no sorodiagnóstico da esporotricose nas técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese, nas quais não foram observadas reações cruzadas frente a soros de pacientes com leishmaniose ou cromoblastomicose (Albornoz *et al.*, 1984). De fato, Albornoz e seus colaboradores (1984) verificaram que quando os exoantígenos da forma filamentosa de *S. schenckii* são utilizados na imunoeletroforese, todos os soros positivos apresentavam um arco anódico de precipitação, o qual foi denominado arco S. A proteína envolvida na formação deste arco de precipitação provavelmente está relacionada à alta sensibilidade observada no teste imunoenzimático descrito neste trabalho, o qual utilizou a mesma preparação antigênica. Entretanto, como este antígeno não foi purificado e caracterizado até hoje, maiores estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Mais recentemente também foi demonstrado que as proteínas secretadas por *S. schenckii* são as grandes responsáveis pela resposta imune humoral na esporotricose (Carlos *et al.*, 2003). Por esses motivos resolvemos caracterizar esta preparação antigênica utilizada na padronização de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico da esporotricose.

O complexo antigênico estudado por nós apresentou cinco proteínas que foram possíveis de serem detectadas através de coloração pela prata de um gel de poliacrilamida submetido a eletroforese. Analisando a reatividade destas moléculas pela técnica de imunoblot verificou-se que as proteínas de menor peso molecular é que parecem ser espécie-específicas. Para melhor compreender a natureza desses antígenos, duas proteínas, uma aparentemente específica e outra que apresentou reatividade cruzada no imunoblot, foram submetidas a

MALDI-TOF-MS e surpreendentemente obtivemos peptídeos idênticos nas duas moléculas. Inicialmente suspeitou-se em contaminação do material analisado como razão para explicar este achado, porém há diversos fatores que sugerem o contrário: i) os peptídeos encontrados apresentaram homologia com uma proteína de *S. cerevisiae*, um fungo, ascomiceto, tal qual *S. schenckii*; ii) a proteína de *S. cerevisiae* que apresentou homologia com os peptídeos encontrados apresenta peso molecular de 97 kDa, similar aos 90 kDa da proteína submetida à MALDI-TOF-MS; iii) análise computacional da proteína de *S. cerevisiae* mostra que ela apresenta elevado índice antigênico, podendo ter epítomos B, fato demonstrado nas proteínas submetidas à MALDI-TOF-MS, altamente reativas contra IgG conforme demonstrado no nosso imunoblot; iv) a proteína de *S. cerevisiae* com homologia à proteína de *S. schenckii* submetida a MALDI-TOF-MS apresenta atividade enzimática, tal qual a maioria dos antígenos fúngicos (Fonseca *et al.*, 2001); v) o experimento, quando repetido, apresentou os mesmos resultados.

Assim sendo, pode-se sugerir que duas das proteínas secretadas por *S. schenckii* em sua fase estacionária de crescimento na forma filamentosa participem do complexo histona desacetilase como a proteína STB2 de *S. cerevisiae*. A proteína de 37 kDa, com peptídeos idênticos à proteína de 90 kDa, poderia ser um produto de degradação da de maior peso molecular. Um fator que suporta esta idéia é o fato de que os seis peptídeos seqüenciados encontram-se nos 300 aminoácidos mais próximos à região N terminal da proteína STB2 de *S. cerevisiae*, o que resultaria numa proteína de 34 kDa, conforme calculado no algoritmo computacional Compute pI/MW (disponível em <http://www.expasy.ch/tools/#primary>). Este produto de degradação poderia ter perdido partes da molécula maior que apresentasse epítomos comuns com os agentes das doenças estudadas neste trabalho, o que resultou na ausência de reatividade cruzada da proteína com peso molecular menor na reação de imunoblot.

A proteína STB2 em *S. cerevisiae* forma um complexo com a proteína Sin3p, o qual possui atividade de histona desacetilase. STB2 foi identificada a partir de ensaios duplo-híbrido para verificar proteínas que se ligassem a Sin3p, já que ela por si só é incapaz de ligar-se ao DNA diretamente (Kasten & Stillman, 1997). A evidenciação de uma proteína que participa em um complexo com atividade de histona desacetilase, de localização preferencialmente nuclear, sendo secretada no sobrenadante de cultura nos chamou a atenção. Entretanto, Nosanchuk e colaboradores (2003) identificaram uma histona H2B de 17 kDa na superfície do fungo dimórfico *H. capsulatum*. Além disso, também foi recentemente descrito que histona desacetilases também podem realizar sua função enzimática em proteínas que não sejam histonas (Hildmann *et al.*, 2007). Desta forma, proteínas relacionadas à histonas podem

ter algum papel na biologia celular de fungos patogênicos ao serem secretadas e expressas em suas superfícies.

A resposta de um hospedeiro a uma infecção microbiana envolve uma série de interações do microrganismo e os mecanismos de imunidade inata e adaptativa do hospedeiro. Neste sentido, embora haja uma série de informações sobre a importância da resposta imune celular nas diversas infecções fúngicas, o papel dos anticorpos nestas micoses é pouco conhecido (Nosanchuk, 2005) e a situação da esporotricose não é diferente. Alguns dos mecanismos pelos quais os anticorpos protegem o hospedeiro de infecções fúngicas envolvem aglutinação de células fúngicas, interferência com adesão, aumento da fagocitose, neutralização de moléculas imunorreguladoras e ativação do sistema complemento (Casadevall, 1995). Além disso, há certos anticorpos produzidos durante a infecção que não conferem nenhuma proteção e outros que, pelo contrário, aumentam a gravidade da doença (Casadevall, 1995; Pirofski & Casadevall, 1996; Casadevall & Pirofski, 2006). Como neste estudo não foi verificada diferença estatisticamente significativa nos níveis de anticorpos de diferentes isotipos nas diferentes formas clínicas da esporotricose, não podemos sugerir se os anticorpos gerados contra exoantígenos de *S. schenckii* são protetores ou se eles aumentam a gravidade da doença. Por sua vez, observamos que todos os pacientes com a forma cutânea fixa da esporotricose envolvidos nos estudos de padronização da ELISA para esporotricose, bem como nos envolvidos na análise do perfil de anticorpos produzidos durante a infecção, apresentaram níveis detectáveis de anticorpos dos três isotipos estudados e é possível que esses anticorpos tenham tido algum papel na prevenção da disseminação do fungo. Com a caracterização, purificação e clonagem de moléculas antigênicas de *S. schenckii* que iniciamos neste estudo será possível produzir anticorpos monoclonais contra este patógeno para verificar a veracidade desta hipótese.

Conclusões

Uma técnica de ELISA utilizando exoantígenos de *S. schenckii* foi padronizada com sucesso, apresentando uma sensibilidade de 97%, especificidade de 89% e uma eficiência de 92%, sugerindo que este ensaio têm potencial para ser utilizado como uma ferramenta adicional no diagnóstico da esporotricose, em especial em sua forma cutânea que ocorre na maioria dos pacientes infectados por *S. schenckii*.

O alto valor preditivo negativo do teste (98%) sugere que este ensaio pode ser útil para eliminar a hipótese diagnóstica de esporotricose no diagnóstico diferencial de lesões dermatológicas.

Esta técnica também demonstrou ser reprodutível, o que favorece sua aplicação no sorodiagnóstico da esporotricose.

A mesma técnica de ELISA pôde ser utilizada no estudo de isotipos de imunoglobulinas produzidas na infecção, sendo verificado que IgG, IgM e IgA são produzidas durante a infecção e que mesmo durante o tratamento seus níveis continuam detectáveis, com níveis decrescentes à medida que a terapia antifúngica se estende.

Esses isotipos também podem ser pesquisados com finalidades diagnósticas e para acompanhamento terapêutico da esporotricose.

Para aumentar a eficácia do diagnóstico sorológico da esporotricose é altamente recomendado que sejam detectados estes três isotipos de imunoglobulinas e que uma combinação de resultados seja realizada para que um resultado com maior acurácia seja fornecido.

Os antígenos de *S. schenckii* embora tenham sido recentemente mais aplicados à técnicas diagnósticas ainda carecem de devido estudo e conveniente caracterização. Uma das moléculas antigênicas de *S. schenckii* apresenta homologia com a proteína STB2 de *S. cerevisiae*, uma proteína envolvida na formação de um complexo de histona desacetilase, apresentando um produto de degradação que apresenta maior especificidade e que têm potencial para ser purificado e utilizado numa reação imunoenzimática para fornecer resultados mais específicos.

Referências Bibliográficas

Agudelo SP, Restrepo S, Velez ID. Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1999; 40:1002-1004.

Albornoz MB, Villanueva E, Torres ED. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia.* 1984; 85: 177-183.

Albuquerque CF, Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:1944-1946.

Almeida-Paes R, Albuquerque PC, Pizzini CV, Peralta JM, Zancopé-Oliveira RM. Estudo dos antígenos de superfície do fungo patogênico *Sporothrix schenckii*. In: Anais da VIII Semana de Microbiologia e Imunologia – UFRJ; 2002 Nov 04-08; Rio de Janeiro, Brasil.

Almeida-Paes R. Identificação e caracterização de antígenos do fungo *Sporothrix schenckii*. Rio de Janeiro; 2004. Bacharelado [Monografia de Conclusão de Curso em Microbiologia e Imunologia] – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PCF, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:244-249.

Al-Tawfiq JA, Wools KK. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 1998; 26:1403-1406.

Baida H, Biselli PJ, Juvenale M, Del Negro GM, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1999; 1:273-278.

Baker JH, Goodpasture HC, Kuhns HR, Rinaldi MG. Fungemia caused by an amphotericin B resistant isolate of *Sporothrix schenckii*: successful treatment with itraconazole. *Arch Pathol Lab Med.* 1989; 113:1279-1281.

Barros MBL, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Lazéra MS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Marzochi KBF, Wanke B, Valle ACF. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:777-779.

Barros MBL, Schubach AO, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Reis RS, Conceição MJ, Valle ACF. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.* 2003; 42:677-681.

Barros MBL, Schubach AO, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TMP, Reis RS, Wanke B, Marzochi KBF, Conceição MJ. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Clin Infect Dis*. 2004; 38:529-535.

Barros MBL, Schubach AO, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Conceição-Silva F, Matos-Salgueiro M, Mouta-Confort E, Reis RS, Madeira MF, Cuzzi T, Quintella LP, Passos JPS, Conceição MJ, Marzochi MCA. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop*. 2005; 93:41-47.

Bernardes-Engemann AR, Orofino RC, Miguens BP, Penha CVL, Neves E, Pereira BAS, Dias CMP, Mattos M, Gutierrez-Galhardo MC, Lazéra MS, Schubach AO, Oliveira-Neto MP, Lopes-Bezerra LM. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2005; 43:487-493.

Berbee ML, Taylor JW. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Exp Mycol*. 1992; 16:87-91.

Blumer SO, Kaufman L, Kaplan W, McLaughlin DW, Kraft DE. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. *Appl Microbiol*. 1973; 26:4-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Angkuster J, Alviano CS, Silva CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia*. 1992; 117:139-144.

Carlos IZ, Zini MM, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*. 1994; 127:189-194.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Placeres MCP. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 1998; 144:9-14.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Placeres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- α . *Scand J Immunol*. 2003; 57:214-220.

Carrada-Bravo T. New observations on the epidemiology and pathogenesis of sporotrichosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1975; 69:267-273.

Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, Jesus AR. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*. 2007; 29:251-258.

Casserone S, Conti-Diaz IA, Zanetta E, Pereira MEP. Serologia de la esporotricosis cutânea. *Sabouraudia*. 1983; 21:317-321.

Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun*. 1995; 63:4211-4218.

- Casadevall A. Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe*. 2006; 1:359-364.
- Casadevall A, Pirofski LA. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv Immunol*. 2006; 91:1-44.
- Castro RM, Sabogal MF, Cuce LC, Salebian A. Disseminate sporotrichosis - report of a clinical case with mucocutaneous, osteo-articular, and ocular lesions. *Mykosen*. 1981; 24:92-96.
- Chalkley RJ, Baker PR, Huang L, Hansen KC, Allen NP, Rexach M, Burlingame AL. Comprehensive Analysis of a Multidimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Dataset Acquired on a Quadrupole Selecting Quadrupole Collision Cell, Time-of-flight Mass Spectrometer. II. New Developments in Protein Prospector Allow for Reliable and Comprehensive Automatic Analysis of Large Datasets. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4:1194-1204.
- Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases. Wolfe Medical Publications Ltd p. 112-115. 1980.
- Chaturvedi AK, Kavishwar A, Shiva Keshava GB, Shukla PK. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12:1063-1068.
- Cheatwood JL, Jacobson ER, May PG, Farrell TM, Homer BL, Samuelson DA, Kimbrough JW. An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a free-ranging population of pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Florida. *J Wildl Dis*. 2003; 39:329-337.
- Chua SS, Momany M, Mendoza L, Szaniszló PJ. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii*. *Curr Microbiol*. 1994; 29:151-156.
- Civila ES, Bonasse J, Conti-Diaz IA, Vignale RA. Importance of direct fresh examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol*. 2004; 43:808-810.
- Coles FB, Schuchat A, Hibbs JR, Kondracki SF, Salkin IF, Dixon DM, Chang HG, Duncan RA, Hurd NJ, Morse DL. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. *Am J Epidemiol*. 1992; 136:475-487.
- Conti-Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*. 1989; 108:113-116.
- Cooper CR, Dixon DM, Salkin IF. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J Med Vet Mycol*. 1992a; 30:169-171.
- Cooper CR, Breslin BJ, Dixon DM, Salkin IF. DNA typing of isolates associated with the 1988 sporotrichosis epidemic. *J Clin Microbiol*. 1992b; 30:1631-1635.
- Davis BA. Sporotrichosis. *Dermatol Clin*. 1996; 14:69-76.

Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, Coles FB. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29:1106-1113.

Dixon DM, Duncan RA, Hurd NJ. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:951-954.

Dooley DP, Bostic PS, Beckius ML. Spook house sporotrichosis. A point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted-house. *Arch Intern Med.* 1997; 157:1885-1887.

Esterre P, M. Jahevitra M, Ramarcel E, Adriantsimahavandy A. Evaluation of the ELISA technique for the diagnosis and the seroepidemiology of chromoblastomycosis. *J Mycol Med.* 1997; 7:137-141.

Esterre P, Jahevitra M, Adriantsimahavandy A. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7:497-500.

Fernandes KS, Coelho AL, Lopes-Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology.* 2000; 101:563-569.

Figueiredo CC, Lima OC, Carvalho L, Lopes-Bezerra LM, Morandi V. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microb Path.* 2004; 36:177-188.

Fonseca CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA. Two dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2001; 3:535-542.

Freitas D, Moreno G, Saliba A, Bottino J, Mós E. Esporotricose em cães e gatos. *Rev Fac Med Vet S Paulo.* 1965; 7:381-387.

García ME, Blanco JL. Mycoses in domestic animals. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17:S2-S7.

Gezuele E, Rosa D. Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol.* 2005; 22:147-150.

Greiner M, Sohr D, Gobel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Methods.* 1995; 185:123-132.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med.* 2000; 45:23-41.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12:454-500.

Guimarães AJ, Pizzini CV, Guedes HLM, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, Zancopé-Oliveira RM. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J Med Microbiol.* 2004; 53:509-514.

Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Barros MBL, Blanco TCM, Cuzzi-Maya T, Schubach TMP, Lazéra MS, Valle ACF. Erythema nodosum associated with sporotrichosis. *Int J Dermatol.* 2002; 41:114-116.

Gutierrez-Galhardo MC, Barros MBL, Schubach AO, Cuzzi-Maya T, Schubach TMP, Lazéra MS, Valle ACF. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005; 19:507-509.

Hajjeh R, McDonnel S, Reef S, Licitra C, Hankins M, Toth B, Padhye A, Kaufman L, Pasarell L, Cooper CR, Hutwagner L, Hopkins R, McNeil M. Outbreak of sporotrichosis among three nursery workers. *J Infect Dis.* 1997; 176:499-504.

Hammilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii: current status and future trends. *Med Mycol.* 1998; 36:351-364.

Hampton DE, Adesina A, Chodosh J. Conjunctival sporotrichosis in the absence of antecedent trauma. *Cornea.* 2002; 21:831-833.

Hardman S, Stephenson I, Jenkins DR, Wiselka MJ, Johnson EM. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. *J Infect.* 2005; 51:73-77.

Hekton L, Perkins CF. 1900. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. *J Exp Med.* 5:77-91.

Hildmann C, Riestler D, Schwienhorst A. Histone deacetylases - an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 75:487-497.

Hintz WE. Sequence analysis of the chitin synthase A gene of the Dutch elm pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* indicates a close association with the human pathogen *Sporothrix schenckii*. *Gene.* 1999; 237:215-221.

Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9:469-488.

Ishizaki H, Nakamura Y, Kariya H, Iwatsu T, Wheat R. Delayed hypersensitivity cross-reactions between *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis* species in sporotrichotic patients. *J Clin Microbiol.* 1976; 3:545-547.

Ishizaki H, Wheat RW, Kiel DP, Conant NF. Serological cross-reactivity between *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis*, *Europhium* and *Graphium* species. *Infect Immun.* 1978; 21:585-593.

Ishizaki H, Nakamura Y, Wheat RW. Serological cross-reactivity between *Sporothrix schenckii* and various unrelated fungi. *Mycopathologia.* 1981; 73:65-68.

Itoh M, Okamoto S, Kariya H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. *Dermatologica.* 1986; 172:209-213.

Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:708-717.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. 2000. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.* 4ª ed., Porto Alegre, ArtMed.

Jin X, Zhang H, Hiruma M, Yamamoto I. Mother-and-child cases of sporotrichosis infection. *Mycoses*. 1990. 33:33-36.

Kauffman CA. Old and new therapies for sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 1995; 21:981-985.

Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, Yoshida S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. *Infect Immun*. 2004. 72:5073–5079.

Karlin JV, Nielsen HS. Serologic aspects of sporotrichosis. *J Infec Dis*. 1970; 121:316-327.

Kasten MM, Stillman DJ. Identification of the *Saccharomyces cerevisiae* genes STB1-STB5 encoding Sin3p binding proteins. *Mol Gen Genet*. 1997; 256:376-386.

Kohler LM, Hamdam JS, Ferrari TC. Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and in vitro analysis for antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 58:117-120.

Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen HD. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12: 1077-1081.

Kostiala AA, Kostiala I. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgM, IgG and IgA class antibodies against *Candida albicans* antigens: development and comparison with other methods. *Sabouraudia*. 1981. 19:123–134.

Kozel TR. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9:34-46.

Kusuhara M, Hachisuka H, Sasai Y. Statistical survey of 150 cases of sporotrichosis. *Mycopathologia*. 1988; **102**: 129-133.

Kwon-Chung KJ, Hill WB, Bennett JE. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *J Clin Microbiol*. 1981; 13:383-387.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Sporotrichosis In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p. 707-729.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:280-285.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12:310-350.

Lima OC, Lopes-Bezerra LM. Identification of a Concanavalin A antigen of the cell surface of *Sporothrix schenckii*. *J Med Vet Mycol*. 1997; 35:167-172.

Lima OC, Figueiredo CC, Pereira BAS, Coelho MGP, Morandi V, Lopes-Bezerra LM. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32:651-657.

Lima OC, Figueiredo CC, Previato JO, Mendonça-Previato L, Morandi V, Lopes-Bezerra LM. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun*. 2001; 69:6874-6880.

Lima OC, Bouchara JP, Reiner G, Marot-Leblond A, Chabasse D, Lopes-Bezerra LM. Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. *Microb Pathog*. 2004; 37:131-140.

Lober C, Kaplan R, Herron C. *Sporothrix schenckii* inoculation on the abdomen. *South Med J*. 1980; 73:1637-1638.

Lopes J, Alves S, Mari C, Brum L, Westphalen J, Altermann M, Prates F. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32:541-545.

Lopes-Alves L, Travassos LR, Previato JO, Mendonça-Previato L. Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycobiology*. 1994; 4:281-288.

Lopes-Bezerra LM, Schubach AO, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc*. 2006; 78:293-308.

Loureiro y Penha, CV, Lopes-Bezerra LM. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. *Med Mycol*. 2000; 38:1-7.

Lutz A, Splendore A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. *RevMed S Paulo*. 1907; 21:433-450.

Maia DC, Sassa MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 2006; 161:11-19.

Malliaris DS, Steenbergen JN, Casadevall, AC. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med Mycol*. 2004; 42:149-158.

Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Lazéra MS, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3251-3256.

Marques SA, Franco SRVS, Camargo RMP, Dias LDF, Naddad-Junior V, Fabris VE. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): Transmissão humana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1993; 35:327-30.

Martinko JM. Animal-transmitted, vectorborne, and common-source microbial diseases. In: Madigan MT, Martinko JM, Parker J (eds). *Brock Biology of Microorganisms*. 9th ed., New Jersey: Prentice Hall, 2000. p. 956-991.

Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1984; 20:103-108.

Mendes-Giannini MJS, Andreotti PF, Vincenzi LR, Silva JL, Lenzi HL, Bernard G, Zancopé-Oliveira RM, Guedes HLM, Soares CP. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect*. 2006; 8:1550-1559.

- Mendoza M, Diaz AM, Hung MB, Zambrano EA, Díaz E, de Albornoz MC. Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. *Med Mycol.* 2002; 40:447-454.
- Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúñiga G, Toriello C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:3004-3011.
- Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatology.* 2002; 27:427-431.
- Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, Casadevall A, Hamilton AJ. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2003; 71:4026-4033.
- Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem.* 1981; 117:307-310.
- Nascimento RC, Almeida SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 43:241-247.
- Nakamura Y, Ishizaki H, Wheat RW. Serological cross-reactivity between group B *Streptococcus* and *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis* species and *Graphium* species. *Infect Immun.* 1977; 16:547-549.
- Neville DM, Glossmann H. Coomassie blue R-250 Heavy. *Meth Enzymol.* 1974; 32:92-102.
- Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS, Casadevall A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest.* 2003; 112:1164-1175.
- Nosanchuk JD. Protective antibodies and endemic dimorphic fungi. *Curr Mol Med.* 2005; 5:435-442.
- Oliveira-Neto MP, Matos M, Lazera MS, Reis RS, Chicarino-Coelho JM. Zoonotic sporotrichosis transmitted by cats in Rio de Janeiro, Brazil: a case report. *Dermatol Online J.* 2002; 8:5.
- O'Reilly LC, Altman SA. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2547-2552.
- Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis.* 2000; 30:65-70.
- Pereira BAS, Penha CVL, Bernardes AR, Orofino R, Lopes-Bezerra LM. Serological and Western Immunoblotting analysis and structural characterization of antigens from three *Sporothrix schenckii* strains. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2003 nov 17-20; Florianópolis, Brasil.
- Pirofski LA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans*: paradigm for the role of antibody immunity against fungi? *Zentralbl. Bakteriol.* 1996; 284:475-495.

Pizzini CV, Zancopé-Oliveira, RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6:20-23.

Polonelli L, Morace G. Exoantigen studies of *Sporothrix schenckii*, *Ceratomyces minor* and *Graphium penicillioides* cultures. *J Clin Microbiol.* 1982; 15:362-365.

Quintal D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. *J Cutan Med Surg.* 2000; 4:51-54.

Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1993; 16:384-387.

Reis RS. Análise genotípica de amostras de *Sporothrix schenckii* isoladas em epidemia de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2004. Mestrado [Dissertação em Biologia Celular e Molecular]. Fundação Oswaldo Cruz.

Rippon JW. Sporotrichosis. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1988. p.325-352.

Rivera J, Casadevall A. Mouse genetic background is a major determinant of isotype-related differences for antibody-mediated protective efficacy against *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol.* 2005; 174:8017-8026.

Rodrigues MT, Resende MA. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil. *Mycopathologia.* 1996; 135:89-98.

Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 2000; 68:3696-3703.

Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52:451-459.

Santos IB, Schubach TMP, Leme LRP, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA, Quintela LP, Madeira MF, Coelho FS, Reis RS, Schubach AO. Sporotrichosis: the main differential diagnosis with tegumentary leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2007; 143:1-6.

Schenck BR. Refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1898. 9: 286-290.

Schubach AO, Barros MBL, Moreira JS, Saldanha AC, Fabri ML, Schubach TMP, Monteiro PCF, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Pereira SA, Conceição MJ, Gutierrez-Galhardo MC, Valle ACF. Esporotricose primária da mucosa nasal. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36 (suppl 1):222.

Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. *N Engl J Med.* 2005a; 353:1185-1186.

Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL, Wanke B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2005b; 11:1952-1954.

Schubach AO, Barros MBL, Schubach TMP, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Sued M, Salgueiro MM, Monteiro PCF, Reis RS, Marzochi KBF, Wanke B, Conceição-Silva F. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea.* 2005c; 24:491-493.

Schubach TMP, Schubach AO. Esporotricose em gatos e cães - revisão. *Clinica Veterinária.* 2000; 29:21-24.

Schubach TMP, Schubach AO, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro DF, Barros MBL, Brustein R, Zancopé-Oliveira RM, Monteiro PCF, Wanke B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia.* 2001a; 153:83-86.

Schubach TMP, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Marzochi KBF, Schubach AO. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol.* 2001b; 39:147-149.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Pellon IV, Monteiro PCF, Reis RS, Barros MBL, Andrade-Perez M, Wanke B. Haematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. *J Small Anim Pract.* 2003a; 44:395-398.

Schubach TMP, Schubach AO, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PCF, Gutierrez-Galhardo MC, Wanke B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats of Rio de Janeiro. *Vet Rec.* 2003b; 152:172-175.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA, Leme LRP, Santos IB, Reis RS, Almeida-Paes R, Perez MA, Marzochi MCA, Valle ACF, Wanke B. Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2004a; 41:404-408.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi T, Monteiro PCF, Reis RS, Perez MA, Wanke B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1988-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2004b; 224:1623-1629.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi T, Pereira SA, Santos IB, Almeida-Paes R, Leme LRP, Wanke B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol* 2006; 44:87-92.

Scott EN, Muchmore HG, Fine DP. Activation of the alternative complement pathway by *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun.* 1986; 51:6-9.

Scott EN, Muchmore HG. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:300-304.

Sigler L, Harris JL, Dixon DM, Flis AL, Salkin IF, Kemna M, Duncan RA. Microbiology and potential virulence of *Sporothrix cyanescens*, a fungus rarely isolated from blood and skin. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:1009-1015.

- Smith PW, Loomis GW, Luckasen JL, Osterholm RK. Disseminated cutaneous sporotrichosis: three illustrative cases. *Arch Dermatol*. 1981; 117:143-144.
- Smith TM, Batenburg-van der Vegte WH. Ultrastructure of septa in *Blastobotrys* and *Sporothrix*. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol*. 1985; 51:121-128.
- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun*. 2004; 72: 3478-3488.
- Sterling JB, Heymann WR. Potassium iodide in dermatology: a 19th century drug for the 21st century-uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. *J Am Acad Dermatol*. 2000; 43:691-697.
- St-Germain G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. In: A clinical laboratory handbook. California: Star Publishing Company. 1996.
- Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Med Mycol*. 1998; 36:21-27.
- Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4⁺ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol*. 1999; 37:397-404.
- Takata M, Ishizaki H. Correlation among culture times, sugar composition and biological activities of *Sporothrix schenckii* antigens. *Mycopathologia*. 1983; 84:31-39.
- Talhari S, Cunha MG, Schettini AP, Talhari AC. Deep mycoses in Amazon Region. *Int J Dermatol*. 1988; 27:481-484.
- Torinuki W, Tagami H. 1985. Complement activation by *Sporothrix schenckii*. *Arch Dermatol Res*. 277:332-333.
- Triles L, Fernandez-Torres B, Lazéra MS, Wanke B, Schubach AO, Almeida-Paes R, Inza I, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:3952-3954.
- Tsang, VCW, Peralta JM, Simons AR. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1983; 92:377-391.
- Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, Nakahara T, Fukagawa S, Kawasaki M, Kajiwara H, Yoshida S, Moroi Y, Furue M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origin to determine their different virulence. *Int Immunol* 2006; 18:1637-1646.
- Valle ACF, Costa RLB, Monteiro PCF, von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2001. 39:373-377.

van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspifungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3394-3400.

Vicentini AP, Geszteszi JL, Franco MF, Souza W, Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62:1465-1469.

Wheat LJ, Morris LVF, Kamel S, Tewari RP. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *J Clin Microbiol.* 1986; 23:493-499.

Whittemore JC, Webb CB. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. *Can Vet J.* 2007; 48:411-414.

Winters MS, Day RA. Detecting protein-protein interactions in the intact cell of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *J Bacteriol.* 2003; 185:4268-4275.

Woods JP. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6: 327-331.

Yelverton CB, Stetson CL, Bang RH, Clark JW, Butler DF. Fatal sporotrichosis. *Cutis.* 2006; 78:253-256.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Wanke B, Peralta JM. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Clin Diag Lab Immunol.* 1994; 1: 390-393.

Anexo 1

Artigo publicado no periódico *Clinical and Vaccine Immunology*, em março de 2007, referente à padronização da técnica de ELISA intitulado **“Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection.”**

Use of Mycelial-Phase *Sporothrix schenckii* Exoantigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Sporotrichosis by Antibody Detection[∇]

Rodrigo Almeida-Paes,^{1,3} Monique A. Pimenta,¹ Claudia Vera Pizzini,¹ Paulo Cezar F. Monteiro,¹ José Mauro Peralta,² Joshua D. Nosanchuk,^{3,4} and Rosely Maria Zancopé-Oliveira^{1*}

Serviço de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil¹; Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil²; Division of Infectious Diseases, Department of Medicine,³ and Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York⁴

Received 13 November 2006/Returned for modification 14 December 2006/Accepted 2 January 2007

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for specific antibody detection in serum specimens of patients with sporotrichosis. The assay was made with mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens and was tested against 90 sera from patients with different clinical forms of sporotrichosis. Potential cross-reactions were analyzed with 72 heterologous sera from patients with paracoccidioidomycosis, cryptococcosis, aspergillosis, histoplasmosis, tuberculosis, and American tegumentary leishmaniasis, as well as 76 sera from healthy controls. We found a sensitivity of 97% and a specificity of 89% in this assay. Some cross-reactions were seen, as observed in other immunoassays for the diagnosis of sporotrichosis. The ELISA appears to be especially useful for cutaneous forms of disease, since these are not promptly diagnosed with available immunoprecipitation or agglutination techniques. These results suggest that the ELISA using mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens is a very sensitive diagnostic tool for the serodiagnosis of sporotrichosis and can be used in conjunction with conventional methods of diagnosis, particularly in cases where cross-reactions or false-positive results are experienced with the serodiagnosis.

Sporotrichosis is a subcutaneous infection caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* that occasionally results in disseminated disease. This disease has a worldwide distribution, and infection is usually acquired by traumatic inoculation of the fungus into the subcutaneous tissue (18, 23). *S. schenckii* has been isolated from several environmental sources (8, 11, 18, 29), and most sporotrichosis cases occur in professionals who work with thorny plants, such as farmers, gardeners, and forestry workers (8, 11). However, in a recent sporotrichosis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil, transmission of the disease occurred broadly in the populace through the scratches or bites of *S. schenckii*-infected cats, along with a notable increased incidence in veterinarians (4).

Definitive diagnosis of sporotrichosis relies either on direct visualization of the organism in clinical specimens, which lacks sensitivity, and/or the isolation of the source of the organism in culture, which is time-consuming and, in some manifestations of the disease, such as *S. schenckii*-induced arthritis, the collection of material for culture is difficult (23). Although some cases of sporotrichosis are benign, severe disease or unusual presentations can occur in immunocompromised individuals such as human immunodeficiency virus-infected patients and patients with chronic granulomatous disease (3, 15). Therefore, sporotrichosis may be mistaken for other infections, such

as tuberculosis, leishmaniasis, paracoccidioidomycosis, gummatous syphilis, and chromoblastomycosis (28, 31, 33). The delay in the diagnosis of sporotrichosis can lead to fatality (3).

Detection of patients' antibodies offers a more rapid alternative to the diagnosis than that afforded by histology or culture. At present, the detection of host antibodies to *S. schenckii* is accomplished by immunoelectrophoresis and tube agglutination (1, 16). Although several new immunoassays have been developed for the detection of antibodies in the serum samples of patients with histoplasmosis (10, 26), paracoccidioidomycosis (2, 21), chromoblastomycosis (9, 34), and candidiasis (17), there is a paucity of effective immunoassays for the serodiagnosis of sporotrichosis. In addition, these immunoassays involve laborious antigen production procedures (6, 30).

The mycelial phase of the fungus produces a number of exoantigens in culture, especially those of 90 and 50 kDa, which appear to be species specific. The optimum expression of these principal antigenic components of *S. schenckii* occurs in the stationary phase of cultures grown in Sabouraud dextrose broth (22). Accordingly, we describe here the application of mycelial *S. schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody responses in patients with sporotrichosis.

MATERIALS AND METHODS

***S. schenckii* strain and antigen production.** *S. schenckii* 23508 was used in the present study. It was isolated from the dwelling of a patient with sporotrichosis. This isolate was identified by biochemical testing, typical colony morphology, and microscopic appearance of growth on culture medium at 25 and 37°C (8, 18, 28), and this strain is available in the culture collection from the Mycology Branch of Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brazil. This strain was compared to other isolates and was demonstrated to be a prolific antigen pro-

* Corresponding author. Mailing address: Serviço de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Phone: 55 21 3865-9557. Fax: 55 21 2590-9988. E-mail: zancope@ipecc.fiocruz.br.

[∇] Published ahead of print on 10 January 2007.

ducer, with an excellent response when probed with a rabbit hyperimmune antiserum by Western blot analysis (R. Almeida-Paes, unpublished results). The exoantigen used in the ELISA was prepared from the mycelial form of this strain according to the method of Mendoza et al. (22). In brief, Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) was inoculated with *S. schenckii* mycelial phase, followed by incubation at 28°C in a rotatory shaker at 100 rpm for 14 days. Subsequently, culture supernatants were filtered through a 0.45- μ m-pore-size mixed cellulose acetate membrane (Millipore Corp., Billerica, MA), concentrated 10-fold by pervaporation, and dialyzed against distilled water at 4°C for 3 days. Thimerosal (1:5,000) was added as a preservative. The protein concentration was measured by a dye-binding assay with respect to an albumin standard, and the protein profile was studied according to the method of Laemmli (19) in a silver-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (4% stacking gel and 7.5% resolving gel). The antigen mixture was stored at 4°C until use.

Serum samples. Ninety serum specimens obtained from different patients with sporotrichosis (21 male and 69 female, 40.9 \pm 17.2 years [mean age \pm the standard deviation]) were used in the present study. The sera were collected at Fiocruz between March 2000 and December 2004 and stored at -20°C until use. The diagnosis of sporotrichosis was based on the isolation of *S. schenckii* in culture, and the disease manifestations were fixed cutaneous ($n = 22$, 24.4%), lymphocutaneous ($n = 49$, 54.4%), disseminated cutaneous ($n = 16$, 17.8%), extracutaneous ($n = 2$, 2.2% [one osteoarticular, one central nervous system]), and disseminated ($n = 1$, 1.1%). All of the patients with sporotrichosis were evaluated for evidence of underlying immunosuppression in our clinic, and none of the patients were found to have immunological abnormalities. A total of 72 heterologous serum samples from patients with culture-proven diseases that can mimic sporotrichosis were also examined, including paracoccidioidomycosis ($n = 12$), cryptococcosis ($n = 10$), aspergillosis ($n = 5$), histoplasmosis ($n = 15$), tuberculosis ($n = 12$), and American tegumentary leishmaniasis ($n = 18$). Sera from homologous and heterologous groups had been collected before the treatment of their disease, and none of patients had received the sporotrichin skin test. All of the clinical samples were chosen randomly and were obtained from the Immunodiagnostic Section Serum Bank, Mycology Branch, IPEC, Fiocruz, Brazil. In addition, 76 serum samples from blood donors—healthy individuals previously tested for human immunodeficiency virus infection, syphilis, hepatitis B, and Chagas' disease and showing negative results—were included in the present study as negative controls. All serum specimens were collected from individuals living in the city of Rio de Janeiro, Brazil, a region where sporotrichosis is endemic (4).

ELISA. Indirect ELISA was performed as described previously (17), with slight modifications to detect immunoglobulin G (IgG) class antibodies to *S. schenckii*. Antigen was added (40 ng of protein in 100 μ l of carbonate buffer [63 mM; pH 9.6] per well) to 96-well microtiter plates (Nunc-Immuno Starwell, MaxiSorp Surface). This concentration of *S. schenckii* protein was determined by checkerboard titration of twofold dilutions of antigen and high-titer human serum. The plates were incubated for 90 min at 37°C and overnight at 4°C. Plates were washed three times with washing buffer (10 mM phosphate-buffered saline [PBS], 0.1% Tween 20 [pH 7.3]) and blocked with Superblock blocking buffer in PBS (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. The plates were then washed three times with washing buffer, and serum samples were added in duplicate to wells at a 1:4,000 dilution in incubation buffer (10 mM PBS, 0.1% Tween 20, 5% nonfat skimmed milk powder [pH 7.3]) and then incubated at 37°C for 1 h. After three washes, plates were incubated at 37°C for 1 h with goat anti-human IgG-peroxidase conjugate Fc fragment specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA) diluted 1:32,000 in incubation buffer at a final volume of 100 μ l per well. Plates were washed three times, and then the enzymatic reaction was developed with the addition of 100 μ l per well of 0.4 mg of *o*-phenylenediamine dihydrochloride/ml and 0.04% hydrogen peroxide in 10 mM sodium citrate buffer (pH 5.5) at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 50 μ l of 3 M HCl per well. The absorbances were measured on a microplate reader (Bio-Rad model 550) at 490 nm. This experiment was done twice under uniform laboratory conditions to avoid internal variations in order to ascertain the reproducibility of the assay. For each experiment two controls were made: a control to ensure that the secondary antibody was not interacting with the antigen in the plate and a blank control. These two controls consisted of duplicate wells in which no serum was applied but antigen was coated and secondary antibody was added, and additional duplicate wells in which neither antigen, serum, nor conjugate was applied, respectively. The absorbance value for each serum was the mean of the values for each well to which serum was applied. The cutoff point for serum reactivity to the *S. schenckii* mycelial exoantigen was set as the mean plus three standard deviations of values

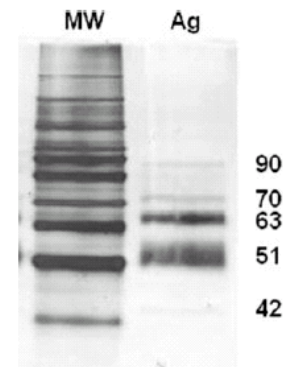


FIG. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profile of the mycelial-phase *S. schenckii* 23508 exoantigen. MW, standard molecular mass; Ag, antigen. The molecular masses (in kDa) of the five protein bands detected in the silver stain are indicated on the right.

of the healthy control patients' sera. Serum samples with absorbance values above the cutoff were considered positive.

Statistical analyses. Analyses were performed by using SPSS 11.0 for Windows software. Comparison between sporotrichosis patients, heterologous patients, and control individuals was made by using the chi-square test. Comparisons of means were made by using the Student unpaired *t* test. A *P* value of ≤ 0.01 was considered statistically significant. In addition, we performed a receiver-operating-characteristic (ROC) analysis in which sensitivity and specificity were calculated as a function of the cutoff value. For this, "1 - the specificity" was plotted against sensitivity, and the area under the curve was calculated.

RESULTS

Antigen analysis. The *S. schenckii* 23508 exoantigen contained 280 ng of protein/ μ l as assayed by the Bradford method (7). The characteristics of the exoantigen are shown in Fig. 1. Silver-stained electrophoresis gel revealed the presence of five protein bands of 90, 70, 63, 51, and 42 kDa, with the 50- and 63-kDa bands being most prominent.

Serological reactivity in the ELISA. The serological reactivity against the mycelial-phase exoantigen was investigated by the described ELISA in the sera of patients with sporotrichosis or other infections and with control serum samples from healthy individuals. The cutoff point for the ELISA was established as the mean absorbance plus three standard deviations of the healthy controls. Accordingly, samples with absorbances higher than 0.582 were considered positive (Fig. 2). With this cutoff, none of control sera were positive. Table 1 summarizes the results obtained with each serum group. Of 90 sporotrichosis patient sera, only three samples gave negative results. Chi-square analysis of sera from individuals with sporotrichosis and the negative controls showed a statistically significant difference between the antibody responses ($\chi^2 = 154.37$, $P < 0.0001$). A total of 72 heterologous sera were also tested in the ELISA, and 16 were found to be positive. Also, chi-square analysis between the positive and negative heterologous sera showed a statistically significant difference ($\chi^2 = 95.73$, $P < 0.0001$), as did the analysis between sera from healthy controls and heterologous sera ($\chi^2 = 18.94$, $P < 0.0001$).

ROC analysis. Figure 3 shows the ROC curve for the ELISA described in the present study. The area under the curve was

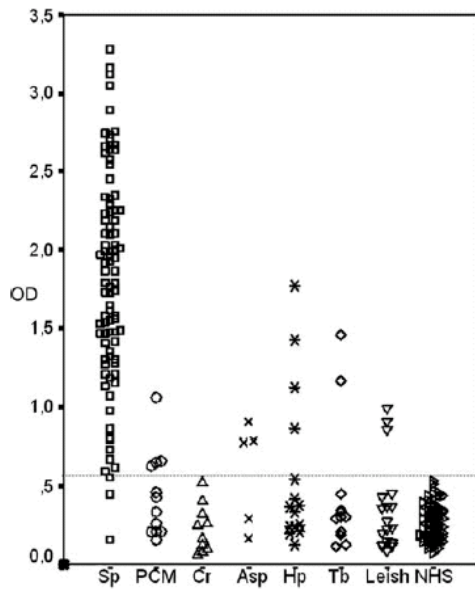


FIG. 2. Detection by ELISA of IgG responses to *S. schenckii* exoantigens in sera from sporotrichosis patients, from patients with other proven infectious diseases, and from healthy controls. The dashed horizontal line shows the cutoff point. Sp, sporotrichosis; PCM, paracoccidioidomycosis; Cr, cryptococcosis; Asp, aspergillosis; Hp, histoplasmosis; Tb, tuberculosis; Leish, leishmaniasis; NHS, normal healthy sera (controls).

0.9767 ± 0.0085, and the chosen cutoff (mean absorbances plus three standard deviations of the healthy controls) achieved the maximum efficacy of the test. The described ELISA had a 97% sensitivity (95% confidence interval [95%CI] = 90.57 to 99.31), a 89% specificity (95%CI = 83.04 to 93.69), a 92% global efficiency (95%CI = 87.81 to 95.13), a 84% positive predictive value (95%CI = 76 to 90.85), and a 98% negative predictive value (95%CI = 93.64 to 99.54).

Serological evaluation of patients with different clinical forms of sporotrichosis. A total of 90 sera from patients with sporotrichosis were analyzed in this ELISA, and 3 of them presented negative results: one from a patient with disseminated cutaneous disease, one with lymphocutaneous infection, and the last patient had the extracutaneous form (infection in

TABLE 1. ELISA results in IgG detection against *S. schenckii* exoantigens

Patient group (no. of patients)	No. of positive patients (%)	Mean absorbance ± SD
Sporotrichosis (90)	87 (97)	1.824 ± 0.681
Paracoccidioidomycosis (12)	4 (33)	0.440 ± 0.267
Cryptococcosis (10)	0 (0)	0.230 ± 0.153
Aspergillosis (5)	3 (60)	0.585 ± 0.330
Histoplasmosis (15)	4 (27)	0.567 ± 0.499
Tuberculosis (12)	2 (17)	0.441 ± 0.421
Leishmaniasis (18)	3 (17)	0.353 ± 0.283
Healthy individuals (76)	0 (0)	0.261 ± 0.107

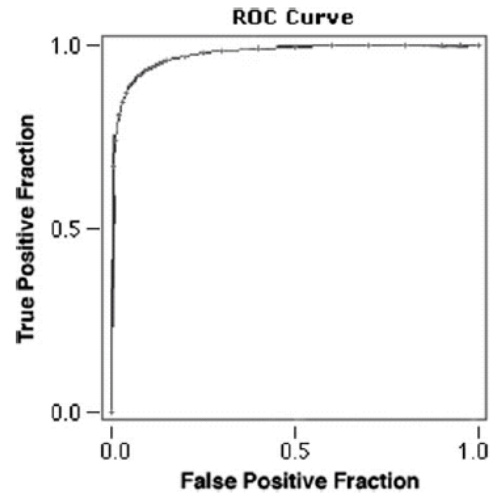


FIG. 3. ROC curve of the described ELISA. The area under the curve is 0.9767 ± 0.0085.

the central nervous system) of sporotrichosis. All sera obtained from patients with the fixed cutaneous forms of sporotrichosis gave positive results. Figure 4 shows the absorbance values of each single serum according to the clinical form of sporotri-

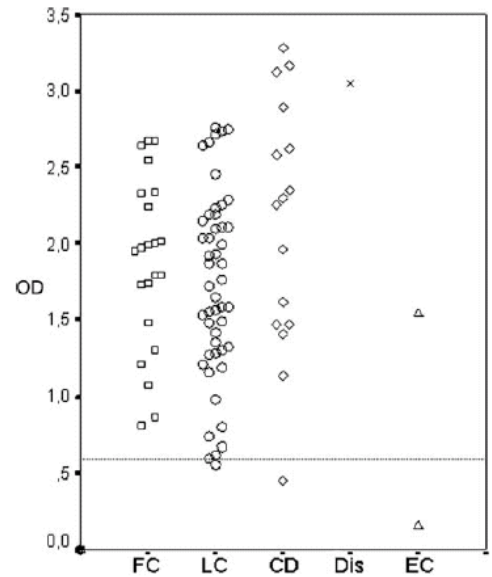


FIG. 4. IgG antibodies responses from patients with different clinical forms of sporotrichosis by ELISA. The dashed horizontal line shows the cutoff point. FC, fixed cutaneous sporotrichosis; LC, lymphocutaneous sporotrichosis; CD, cutaneous disseminated sporotrichosis; Dis, disseminated sporotrichosis; EC, extracutaneous sporotrichosis.

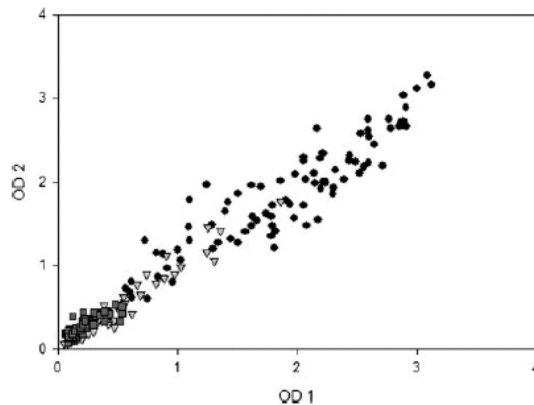


FIG. 5. Distribution and reproducibility of ELISA results in two distinct experiments. Symbols: ●, homologous sera; ▼, heterologous sera; ■, healthy control sera. The correlation coefficient (r^2) between these two experiments was 0.9608.

chosis. Student unpaired t test analysis showed that there is no statistically significant difference between the mean absorbances among distinct sporotrichosis clinical forms.

Cross-reaction analysis. In order to evaluate cross-reactions in the assay, 72 heterologous sera from patients with selected infectious diseases were used in the present study. A specificity of 78% was obtained for the ELISA using the *S. schenckii* mycelial exoantigens with the heterologous sera. Of the 16 false-positive results, 4 were from the sera of patients with paracoccidioidomycosis, 4 were from patients with histoplasmosis, 3 were from patients with aspergillosis, 3 were from patients with leishmaniasis, and 2 were from patients with tuberculosis. Sera collected from 10 patients infected with *Cryptococcus neoformans* were all negative (Table 1). Chi-square analysis revealed statistical differences between the number of positive and negative sera from the tested diseases and sporotrichosis ($\chi^2 = 95.73$; $P < 0.0001$).

The mean absorbances obtained from the sera from the 90 sporotrichosis cases compared to the 76 serum samples from healthy individuals were statistically different as determined by the Student unpaired t test ($t = 22.69$, $P < 0.0001$). Similarly, the absorbance values from sera of patients with sporotrichosis and heterologous sera were statistically different ($t = 19.19$, $P < 0.0001$), as were the values from the heterologous sera and sera from healthy controls ($t = 3.13$, $P = 0.002$).

ELISA reproducibility. To ensure the reproducibility of the described ELISA, the optical density values for each serum obtained in two different assays were compared. The reproducibility of the test is shown in Fig. 5. The correlation coefficient (r^2) was 0.9608, showing uniformity throughout the results for the ELISA described.

DISCUSSION

The detection of antibodies in the sera of sporotrichosis patients by immunoelectrophoresis and agglutination techniques has historically been very useful in the serodiagnosis of this mycosis (1, 16). A limitation of these tests is their lack of

sensitivity in cutaneous sporotrichosis (1, 28). Immunoassays are a very interesting potential solution for this problem because of their high sensitivity. Whereas there have been several described immunoassays for detecting infections due to some dimorphic fungi, such as histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, and penicilliosis (2, 10, 12, 21, 26), to our knowledge there are only two publications of immunoassays for sporotrichosis (6, 30). The recently published ELISA for sporotrichosis (6) utilizes a single cell wall antigen, SsCBF, prepared by affinity chromatography with concanavalin A that is purported to provide less batch-to-batch variation and resulted in 90% sensitivity and 86% global efficiency. Importantly, our new ELISA has a collection of antigens that are easily isolated, especially in laboratories in areas with limited financial resources, and is another alternative for the diagnosis of this life-threatening disease.

The antigenic composition of *S. schenckii* is poorly understood, and there are few described antigens, which complicates the development of specific and sensitive immunoassays. Mendoza et al. described the antigenic composition of mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens and showed that the protein profile of exoantigens produced in Sabouraud dextrose broth did not cross-react with a single serum specimen of coccidioidomycosis, histoplasmosis, and paracoccidioidomycosis (22). The mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens have also been used in immunodiffusion and immunoelectrophoresis assays in which there were no cross-reactions with chromoblastomycosis and leishmaniasis sera (1). Therefore, we decided to standardize and to evaluate the mycelial-phase exoantigens in an ELISA format.

Our ELISA had a 97% sensitivity. All serum samples from patients with different clinical forms of disease showed high absorbance values, suggesting that this test could be broadly applied for the serodiagnosis of sporotrichosis. The mean absorbances of the various cutaneous forms of sporotrichosis were not statistically significantly different, which was also observed by Bernardes-Engemann et al. (6). This is in contrast to what occurs in chromoblastomycosis, another subcutaneous mycosis, where patients with multiple lesions had higher titers of specific IgG compared to patients with localized lesions (9). Although humoral immune responses can participate in the control and prevention of sporotrichosis (25), antibody titers to *S. schenckii* antigens do not appear to be related to the severity of the disease, since patients with a fixed cutaneous lesion have absorbances similar to those of patients with multiple lesions.

Albornoz et al. found that when the mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens are used in immunoelectrophoresis, all positive sera present an anodic arc, called the "S arc" (1). The protein involved in the formation of this precipitation arc may be responsible for the high sensitivity observed in our test because we also used mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens in our ELISA. Since this antigen has not been purified and characterized before now, more studies are necessary to verify this hypothesis.

The measurement of assay performance by ROC analysis indicated a statistically significant difference between the mean absorbances observed in sporotrichosis sera and those achieved in healthy controls and heterologous sera. However, of mean absorbances heterologous sera were statistically different from those encountered in the healthy control group.

The *S. schenckii* antigens are composed mainly of glycoproteins with a high degree of glycosylation, especially with mannosyl, rhamnosyl, and galactosyl (32). Cross-reactivity in serodiagnostic assays for other mycoses has been attributed to such glycosidic moieties (35, 36). *S. schenckii* cross-reactions have been documented with several pathogenic fungi, such as *Exophiala werneckii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, and *Trichophyton mentagrophytes* because of glycosylated epitopes present in antigens from these fungi (13). Cross-reactions between environmental fungi (14, 27) and bacterial species, such as group B streptococcus and *Klebsiella pneumoniae* (24, 32), have also been described. Nonspecific recognition of glycosylated epitopes could explain the cross-reactions observed in our ELISA (22%) and also the differences between the heterologous and healthy control sera. In addition, we could not exclude the possibility of previous exposure to *S. schenckii* in our false-positive patients because all sera used in the present study were collected in an area where sporotrichosis is endemic (4).

In an ELISA using a crude antigen extract from *P. brasiliensis*, cross-reactions were observed with sera from patients with other mycoses, such as histoplasmosis, lobomycosis, cryptococcosis, candidiasis, and sporotrichosis (21). Cross-reactivity could be eliminated by absorbing the sera with *H. capsulatum* antigens before their use in the immunoassay (21). With our *S. schenckii* ELISA, we also observed cross-reactions with some infectious diseases, which similarly occurred in the recently reported ELISA developed by Bernardes-Engemann et al. utilizing the single cell wall antigen (6). In order to reduce cross-reactions, an absorption method could be applied to sera before sporotrichosis ELISA. Another strategy is the deglycosylation of *S. schenckii* antigens, as is currently done in histoplasmosis immunoassays, which increases the specificity of the assay (10, 26). Studies are currently being carried out in our laboratory to verify whether this approach can be applied to *S. schenckii* antigens.

Cutaneous sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis share various clinical and epidemiological characteristics, and some patients infected with *S. schenckii* report that the disease had first appeared as an insect bite, which can lead to a misdiagnosis of the infection by clinicians, especially those with limited laboratory conditions for a correct diagnosis (20). A recent study has shown that up to 48% of sporotrichosis patients react to the Montenegro skin test, and 23% of them are positive in an ELISA using *Leishmania* antigens (5). In our ELISA, 17% of the sera from patients with leishmaniasis were positive, showing that cross-reactions between *S. schenckii* and *Leishmania* occurred. Although cross-reactions in our ELISA were less common than in the *Leishmania* ELISA, it is necessary to identify antigens that discriminate these two diseases, since they have distinct treatments.

The use of this antigen in ELISA gave 97% sensitivity, 89% specificity, and 92% efficiency, showing that this assay can be used as a conjunctive tool for the diagnosis of sporotrichosis. The mycelial exoantigen ELISA's high negative predictive value (98%) suggests that this immunoassay might serve as a useful screen to eliminate sporotrichosis from the differential diagnosis of dermatological lesions in an outbreak setting. Notably, our immunoassay was highly reproducible, which again favors its application in the serodiagnosis of sporotrichosis.

Therefore, the mycelial exoantigen ELISA is an important tool for the diagnosis of sporotrichosis, especially in its cutaneous forms that occur in the majority of patients infected with *S. schenckii* (18, 23, 28).

ACKNOWLEDGMENTS

R.A.-P. was supported in part by an Interhemispheric Research Training Grant in Infectious Diseases, Fogarty International Center (NIH D43-TW007129). J.D.N. was supported in part by NIH AI52733 and AI056070-01A2, a Wyeth Vaccine Young Investigator Research Award from the Infectious Disease Society of America, and the Center for AIDS Research at the Albert Einstein College of Medicine and Montefiore Medical Center (NIH AI-51519). R.M.Z.-O. was in part supported by CNPq 306288/2006-0.

We thank Maria Clara Gutierrez Galhardo and Armando de Oliveira Schubach for providing information about the medical status of the patients included in this study.

REFERENCES

- Albornoz, M. B., E. Villanueva, and E. D. Torres. 1984. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia* 85:177-183.
- Albuquerque, C. F., S. H. Silva, and Z. P. Camargo. 2005. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 43:1944-1946.
- Al-Tawfiq, J. A., and K. K. Woods. 1998. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 26:1403-1406.
- Barros, M. B. L., A. O. Schubach, A. C. F. do Valle, M. C. Gutierrez-Galhardo, F. Conceição-Silva, T. M. Schubach, R. S. Reis, B. Wanke, K. B. Marzochi, and M. J. Conceição. 2004. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin. Infect. Dis.* 38:529-535.
- Barros, M. B. L., A. O. Schubach, A. C. F. do Valle, M. C. Gutierrez-Galhardo, T. M. P. Schubach, F. Conceição-Silva, M. Matos-Salgueiro, E. Mouta-Confort, R. S. Reis, M. F. Madeira, T. Cuzzi, L. P. Quintella, J. P. S. Passos, M. J. Conceição, and M. C. A. Marzochi. 2005. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop.* 93:41-47.
- Bernardes-Engemann, A. R., R. C. Orofino, B. P. Miguens, C. V. L. Penha, E. Neves, B. A. S. Pereira, C. M. P. Dias, M. Mattos, M. C. Gutierrez-Galhardo, M. S. Lazera, A. O. Schubach, M. P. Oliveira-Neto, and L. M. Lopes-Berzerra. 2005. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 43:487-493.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Dixon, D. M., I. F. Salkin, R. A. Duncan, N. J. Hurd, J. H. Haines, M. E. Kemna, and F. B. Coles. 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:1106-1113.
- Esterre, P., M. Jahevitra, and A. Adriansmahavandy. 2000. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:497-500.
- Gutmaries, A. J., C. V. Pizzini, H. L. M. Guedes, P. C. Albuquerque, J. M. Peralta, A. J. Hamilton, and R. M. Zancopé-Oliveira. 2004. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J. Med. Microbiol.* 53:509-514.
- Hajjeh, R., S. McDonnell, S. Reef, C. Licitra, M. Hankins, B. Toth, A. Padhye, L. Kaufman, L. Pasarell, C. Cooper, L. Hutwagner, R. Hopkins, and M. McNeil. 1997. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. *J. Infect. Dis.* 176:499-504.
- Hamilton, A. J. 1998. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. *Med. Mycol.* 36:351-364.
- Ishizaki, H., Y. Nakamura, and R. W. Wheat. 1981. Serological cross-reactivity between *Sporothrix schenckii* and various unrelated fungi. *Mycopathologia* 73:65-68.
- Ishizaki, H., Y. Nakamura, H. Kariya, T. Iwatsu, and R. W. Wheat. 1976. Delayed hypersensitivity cross-reactions between *Sporothrix schenckii* and *Ceratomyces* species in sporotrichotic patients. *J. Clin. Microbiol.* 3:545-547.
- Kajiwar, H., M. Saito, S. Ohga, T. Uenotsuchi, and S. Yoshida. 2004. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. *Infect. Immun.* 72:5073-5079.
- Karlin, J. V., and H. S. Nielsen. 1970. Serologic aspects of sporotrichosis. *J. Infect. Dis.* 121:316-327.
- Kostiala, A. A., and I. Kostiala. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay

- (ELISA) for IgM, IgG and IgA class antibodies against *Candida albicans* antigens: development and comparison with other methods. *Sabouraudia* 19:123-134.
18. Kwon-Chung, K. J., and J. E. Bennett. 1992. *Medical mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia, PA.
 19. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:280-285.
 20. Löber, C., R. Kaplan, and C. Herron. 1980. *Sporothrix schenckii* inoculation on the abdomen. *South. Med. J.* 73:1637-1638.
 21. Mendes-Giannini, M. J. S., M. E. Camargo, C. S. Lacaz, and A. W. Ferreira. 1984. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 20:103-108.
 22. Mendoza, M., A. M. Diaz, M. B. Hung, E. A. Zambrano, E. Diaz, and M. C. de Albornoz. 2002. Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. *Med. Mycol.* 40:447-454.
 23. Morris-Jones, R. 2002. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* 27:427-431.
 24. Nakamura, Y., H. Ishizaki, and R. W. Wheat. 1977. Serological cross-reactivity between group B *Streptococcus* and *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis* species, and *Graphium* species. *Infect. Immun.* 16:547-549.
 25. Nascimento, R. C., and S. R. Almeida. 2005. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43:241-247.
 26. Pizzini, C. V., R. M. Zancopé-Oliveira, E. Reiss, R. Hajjeh, L. Kaufman, and J. M. Peralta. 1999. Evaluation of a Western blot test in an outbreak of acute histoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6:20-23.
 27. Polonelli, L., and G. Morace. 1982. Exoantigen studies of *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis minor*, and *Graphium penicillioides* cultures. *J. Clin. Microbiol.* 15:362-365.
 28. Rippon, J. W. 1988. Sporotrichosis, p. 325-352. *In* J. W. Rippon (ed.), *Medical mycology*. The W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
 29. Sanchez-Aleman, M. A., J. Araiza, and A. Bonifaz. 2004. Aislamiento y caracterización de cepas silvestres de *Sporothrix schenckii* y investigación de reactores a la esporotricina. *Gac. Med. Mex.* 140:507-512.
 30. Scott, E. N., and H. G. Muchmore. 1989. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 27:300-304.
 31. Sharma, S., R. Choudhary, M. Juneja, C. Grover, and B. S. Nagi-Reddy. 2005. Cutaneous tuberculosis mimicking sporotrichosis. *Indian J. Pediatr.* 72:86.
 32. Takata, M., and H. Ishizaki. 1983. Correlation among culture times, sugar composition, and biological activities of *Sporothrix schenckii* antigens. *Mycopathologia* 84:31-39.
 33. Tobin, E. H., and W. W. Jih. 2001. Sporotrichoid lymphocutaneous infections: etiology, diagnosis, and therapy. *Am. Fam. Physician* 63:326-332.
 34. Vidal, M. S. M., L. G. M. Castro, S. C. Cavalcante, and C. S. Lacaz. 2003. Immunoprecipitation techniques and ELISA in the detection of anti-*Fonsecaea pedrosoi* antibodies in chromoblastomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 45:315-318.
 35. Wheat, L. J., L. V. F. Morris, S. Kamel, and R. P. Tewari. 1986. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *J. Clin. Microbiol.* 23:493-499.
 36. Zancopé-Oliveira, R. M., S. L. Bragg, E. Reiss, B. Wanke, and J. M. Peralta. 1994. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:390-393.

Anexo 2

Artigo publicado no periódico *Clinical and Vaccine Immunology*, em setembro de 2007, referente a análise de classes de imunoglobulinas em soro de pacientes com esporotricose intitulado “**Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with Sporotrichosis before and during treatment with itraconazole.**”

Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* Exoantigens in Patients with Sporotrichosis before and during Treatment with Itraconazole[∇]

Rodrigo Almeida-Paes,^{1,2} Monique Amorim Pimenta,¹ Paulo Cezar F. Monteiro,¹
 Joshua D. Nosanchuk,^{2,3} and Rosely Maria Zancopé-Oliveira^{1*}

*Serviço de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas–Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil,¹ and
 Division of Infectious Diseases, Department of Medicine,² and Department of Microbiology and Immunology,³
 Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York*

Received 6 April 2007/Returned for modification 29 May 2007/Accepted 5 July 2007

Sporotrichosis is an important subcutaneous mycosis, with an increasing worldwide incidence. However, few data are available regarding the immunological aspects of *Sporothrix schenckii* infection, particularly the humoral responses to the fungus. In this study we measured immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA in sera from 41 patients with sporotrichosis before antifungal treatment and from another 35 patients with sporotrichosis during itraconazole treatment by using a recently described *S. schenckii* exoantigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). More than 95% of patients had detectable IgA antibodies, and more than 85% had IgM and IgG antibodies before treatment. The number of patients with IgG antibodies increased to 91% during treatment. Conversely, significantly fewer samples from treated patients were positive for IgM (71%) and IgA (89%). Overall, 78% of patients had detectable levels of all isotypes tested at diagnosis, and this percentage dropped to 62.9% in patients receiving itraconazole. Testing of all three isotypes improved the sensitivity; at least two isotypes were detected in 93% of patients before and 89% after treatment. The reactivity of 94 sera from patients with other diseases and healthy individuals was also tested. Cross-reactivity occurred in 33% of the heterologous sera. Most of them were positive only in one isotype, 8.5% were positive for at least two isotypes, and only one serum (1.1%) was positive for the three isotypes. Antibodies produced during *S. schenckii* infection are diverse, and we demonstrate that an exoantigen ELISA for the detection of combinations of IgA, IgG, and IgM antibodies is a highly sensitive and specific diagnostic assay for sporotrichosis.

The host response to infection is the culmination of intricate interactions between a microbe and the host's innate and adaptive immune system. In this context, whereas substantial information is available about the cellular immune response against endemic fungi, the role of antibody in these mycoses is relatively poorly understood (37). Some mechanisms by which antibodies can protect the host against fungal infections include the agglutination of fungal cells, interference with fungal attachment, enhancement of phagocytosis by host effector cells, neutralization of immunoregulatory molecules, and complement activation (13). In addition, antibodies are generated that do not confer protection or even enhance disease (13, 14, 40). Antibody isotypes and their role in the humoral immune response of patients have been studied in several types of mycosis (5, 11, 20, 24, 46, 50). For instance, in paracoccidioidomycosis, there is a differential expression of isotypes to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen, a 43-kDa glycoprotein. Immunoglobulin G (IgG) is found predominantly in patients with the juvenile form of the disease, and IgA is found in patients with the adult form, which has been associated with mucosal protection in the adult form (5). In chromoblasto-

mycosis, high levels of IgM are observed during the course of the disease, presumably due to constant antigen stimulation by continuous low background fungal degradation (20).

Sporotrichosis is a chronic granulomatous disease caused by *Sporothrix schenckii*, a saprophytic dimorphic fungus found on dead or senescent vegetation, such as thorns, hay, straw, sphagnum moss, and wood, and also in soil. For this reason, this subcutaneous mycosis is usually associated with puncture injuries in farmers, florists, leisure gardeners, nursery workers, landscapers, and greenhouse workers. *S. schenckii* exists as a mycelial form in the environment and as a yeast form in humans and other mammals, as well as when cultured at 35 to 37°C (34). No sexual stage has been observed, but the sexual or perfect stage of *S. schenckii* is thought to belong to the genus *Ophiostoma* (31).

Disease caused by *S. schenckii* is usually limited to cutaneous and subcutaneous tissues as a consequence of a traumatic implantation of the fungus into the skin (31, 34). Clinically, it may manifest as lymphocutaneous, fixed cutaneous, disseminated cutaneous, extracutaneous, and disseminated forms and very rarely as a primary pulmonary disease (4). The most common form of extracutaneous sporotrichosis is osteoarthritis (32). Disseminated sporotrichosis is rare, but the frequency of disseminated sporotrichosis is increased in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals (26, 45).

The humoral immune response appears to have a role in prevention and control of sporotrichosis in experimentally infected mice (36); however, there is no information available

* Corresponding author. Mailing address: Serviço de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil. Phone: 55 21 3865-9557. Fax: 55 21 2590-9988. E-mail: zancope@ipecc.fiocruz.br.

[∇] Published ahead of print on 18 July 2007.

about the antibody profile produced during human infection. Recently, our group described an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that is useful for detecting antibodies raised against mycelial exoantigens of *S. schenckii* (3). An outbreak of sporotrichosis has been occurring in Rio de Janeiro, Brazil, since 1998 (8). Sera from patients in this region have been collected either before treatment or during treatment with itraconazole. In this report, we describe the presence of IgG, IgM, and IgA antibodies to *S. schenckii* mycelial exoantigens in sera from patients with sporotrichosis and their application in the serodiagnosis of this mycotic infection.

MATERIALS AND METHODS

Study populations. Sera from two groups of sporotrichosis patients cared for in the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fiocruz, Brazil, were subjected to the exoantigen ELISA. The first group consisted of individuals from whom serum was collected prior to antifungal therapy (41 patients, 15 male and 26 female), and the patients had different clinical forms of sporotrichosis (8 fixed cutaneous, 11 lymphocutaneous, 17 disseminated cutaneous, and 5 extracutaneous). The second group consisted of 35 different patients (7 male and 28 female) whose sera were collected while they were receiving itraconazole for diagnosed sporotrichosis (12 fixed cutaneous, 16 lymphocutaneous, 5 disseminated cutaneous, and 2 extracutaneous). The duration of treatment of these patients ranged from 2 weeks to 13 months. The patients in both groups had sporotrichosis diagnosed based on isolation of *S. schenckii* in culture. Importantly, no immunological abnormalities, including HIV infection, were found in any of the patients. For cross-reactivity assays, serum samples from 68 patients with other culture-proven infectious diseases (13 with histoplasmosis, 12 with tuberculosis, 18 with leishmaniasis, 4 with aspergillosis, 9 with cryptococcosis, and 12 with paracoccidioidomycosis) collected before antifungal therapy and sera from 26 healthy blood donors (negative for antibodies to HIV, hepatitis B virus, *Treponema pallidum*, and *Trypanosoma cruzi*) were tested by the *S. schenckii* ELISA. None of the 170 subjects had received a sporotrichin skin test. The control samples were chosen randomly and were obtained from the Immunodiagnostic Section Serum Bank, Mycology Branch, IPEC.

***S. schenckii* strain and antigen production.** *S. schenckii* 23508, originally isolated from a dwelling of a patient with sporotrichosis, was used in the present study. This isolate was identified by biochemical testing, typical colony morphology, and microscopic appearance of growth on culture medium at 25 and 37°C (19). This strain is available in the culture collection from the Mycology Branch, IPEC-Fiocruz. The exoantigen used in the ELISA was prepared from the mycelial form of this strain according to the method of Mendoza et al. (33). In brief, Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) was inoculated with *S. schenckii* mycelial phase and incubated at 28°C with shaking at 100 rpm for 14 days. Subsequently, culture supernatants were filtered through a 0.45- μ m-pore-size mixed cellulose acetate membrane (Millipore Corp. Billerica, MA), concentrated 10-fold by pervaporation, and dialyzed for 3 days against distilled water at 4°C. Thimerosal (1:5,000) was added as a preservative. The antigen mixture was stored at 4°C until use.

ELISA. Indirect ELISA was performed as described previously (3), with slight modifications to detect IgG, IgM, and IgA class antibodies against *S. schenckii*. Antigen was added (40 ng of protein in 100 μ l of carbonate buffer [63 mM; pH 9.6] per well) to 96-well microtiter plates (Corning, Inc., Costar polystyrene EIA/RIA plates), followed by incubation for 90 min at 37°C and then overnight at 4°C. This concentration of *S. schenckii* protein was determined by checkerboard titration of twofold dilutions of antigen and high-titer human serum. Plates were washed three times with washing buffer (10 mM Tris-buffered saline [TBS], 0.1% Tween 20 [pH 7.3]) and blocked with Superblock blocking buffer in TBS (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. The plates were then washed three times with washing buffer, and serum samples were added in duplicate to wells at 1:4,000, 1:1,000, and 1:800 dilutions for IgG, IgM, and IgA detection, respectively, in incubation buffer (10 mM TBS, 0.1% Tween 20, 5% nonfat skimmed milk powder [pH 7.3]), followed by incubation at 37°C for 1 h. After three washes, the plates were incubated at 37°C for 1 h with goat anti-human IgG, IgM, or IgA alkaline phosphatase conjugate (Southern Biotech, Birmingham, AL) diluted 1:2,000 in incubation buffer at a final volume of 100 μ l per well. Plates were washed three times, and then the enzymatic reaction was developed with the addition of 100 μ l per well of 1.0 mg of *p*-nitrophenyl phosphate/ml in 0.1 M glycine buffer containing 1 mM MgCl₂ and 1 mM ZnCl₂ (pH 10.4) at 37°C for 30 min. The reaction was stopped

by the addition of 25 μ l of 3 M NaOH per well. Absorbances were measured on a microplate reader (Bio-Tek model μ Quant) at 405 nm. This experiment was done twice on different dates under uniform laboratory conditions to avoid internal variations in order to ascertain the reproducibility of the assay. For each experiment two controls were made: secondary antibody alone to ensure that the reagent was not interacting with the antigen in the plate and a blank control to which no antigen, serum or conjugate was applied. The absorbance value reported for each patient was the mean of the values for each well where the patient's serum was applied.

Cutoff determination. In order to choose the best cutoff value that gives high values of sensitivity and specificity, TG-ROC curves were constructed as previously described (23). The cutoff point was determined by the optical density (OD) value that corresponds to the intersection point between sensitivity and specificity plots. In order to determine sensitivities of the tests and the cutoff values, only sera from patients without treatment were used, since antifungal therapy can alter the humoral immune response in mycotic infections (20, 49).

Statistical analyses. Comparisons of means were made by using the Student unpaired *t* test using the GraphPad Prism 3.0 software. Analysis of correlations was made by analysis of variance using SigmaPlot 2000 software. A *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. To evaluate the discriminatory power of the described assays as diagnostic tests, we performed receiver operating characteristics (ROC) analysis of each ELISA using SPSS 14.0, in which sensitivity and specificity were calculated as a function of the cutoff value. For this, (1 - specificity) was plotted against sensitivity, and the area under the curve was calculated.

RESULTS

TG-ROC curves and cutoff determination. The TG-ROC curves for the IgG, IgM, and IgA ELISAs were determined. The analysis of this curve showed cutoff values of 0.418, 0.284, and 0.223 for IgG, IgM, and IgA antibody detection, respectively.

Antibody detection in sera from patients with sporotrichosis. Fig. 1A shows the OD values for IgG in each unique serum from patients with different clinical forms of sporotrichosis. All sera from patients with the fixed cutaneous form of the disease were positive. Two patients with the lymphocutaneous form (18%), 3 patients with the disseminated cutaneous form (18%), and one patient with extracutaneous sporotrichosis (20%) were negative. No statistical differences were observed between the mean OD values of the different clinical forms. Figure 1B shows OD values for IgG in sera from patients with sporotrichosis receiving itraconazole. There were three patient serum samples that were negative by the IgG ELISA: one with the fixed cutaneous form of sporotrichosis (8%), one with lymphocutaneous sporotrichosis (6%) and one with the disseminated cutaneous disease (20%). The durations of the treatments for these patients were 10, 11, and 4 months, respectively.

Figure 1C shows the absorbance values for IgM reactivity in sera from patients with sporotrichosis before antifungal therapy. All of the patients with the fixed cutaneous form of the disease were positive. In contrast, six patients had negative results: one with lymphocutaneous disease (9%), four with the disseminated cutaneous form (24%), and one with extracutaneous disease (20%). No statistical difference was observed between the mean OD values in the IgM detection against mycelial *S. schenckii* antigens. The profile of IgM response in sera from patients receiving itraconazole is shown in Fig. 1D, where 10 patients (3 with the fixed cutaneous form and 7 with the lymphocutaneous form [25 and 44%, respectively]) were found to be negative by the ELISA.

The IgA reactivity profiles of patients with sporotrichosis before and during treatment are shown in Fig. 1E and F,

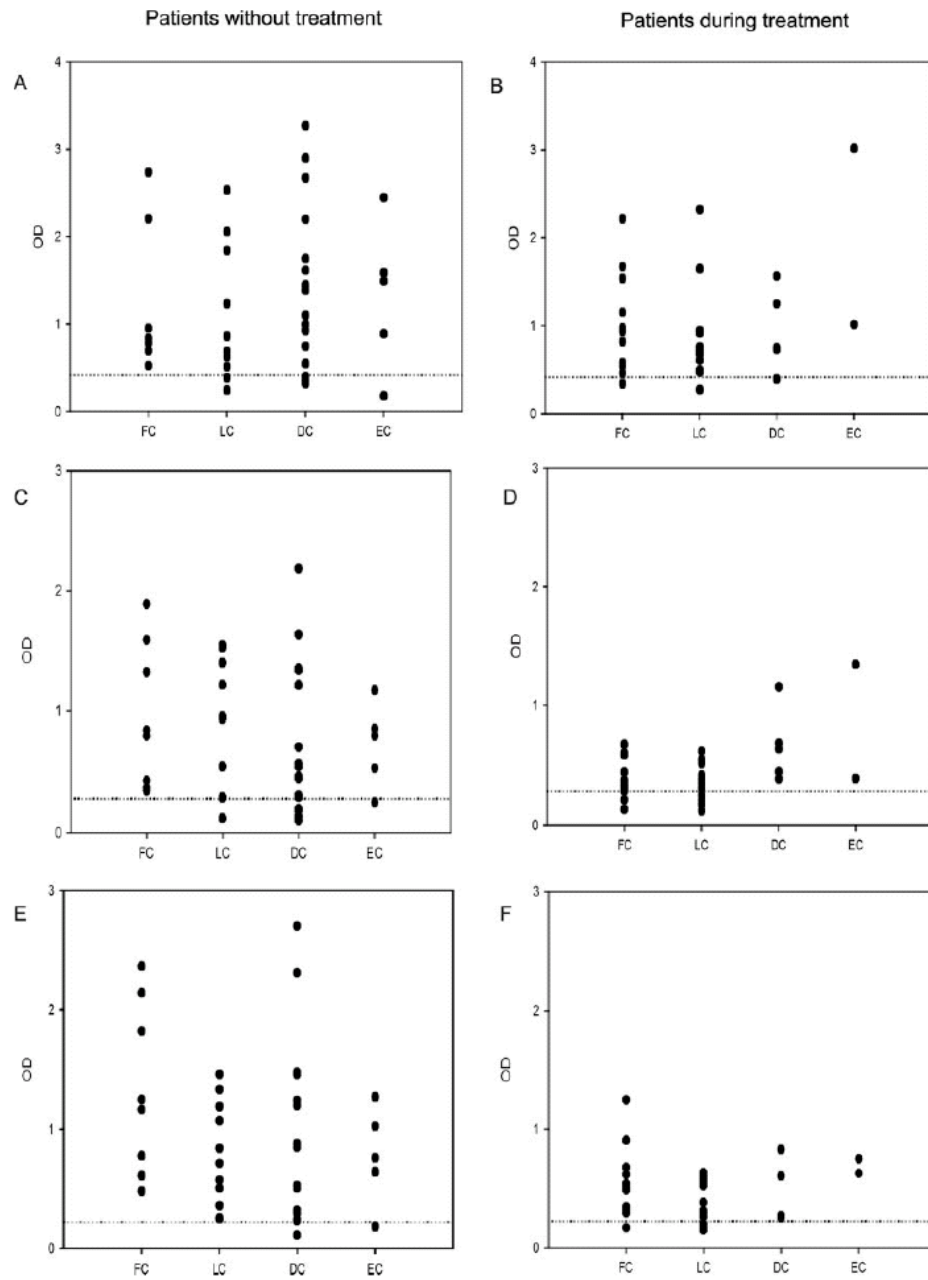


FIG. 1. Antibody levels in patients with several clinical forms of sporotrichosis against mycelial phase *S. schenckii* exoantigens. IgG (A and B), IgM (C and D), and IgA (E and F) ELISA results in patients with sporotrichosis who were not yet treated (A, C, and E) and in those receiving itraconazole (B, D, and F) are shown. Dashed lines indicate cutoff values for each single ELISA. FC, fixed cutaneous sporotrichosis; LC, lymphocutaneous sporotrichosis; DC, disseminated cutaneous sporotrichosis; EC, extracutaneous sporotrichosis.

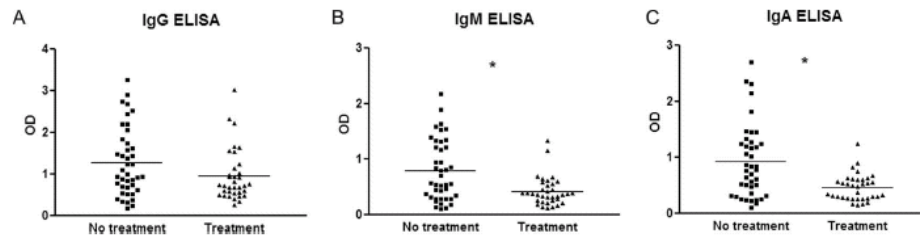


FIG. 2. Comparison between IgG (A), IgM (B), and IgA (C) antibody levels in patients with sporotrichosis in the group not yet treated and in the group receiving itraconazole. *, $P < 0.05$.

respectively. Two patients were negative when tested before antifungal therapy: one with disseminated cutaneous disease and the other with the extracutaneous form. These two patients were also negative for IgG and IgM antibodies. As described above, no immune defects were identified in these patients. Four patients on itraconazole—one with fixed cutaneous disease (8%) and three with lymphocutaneous sporotrichosis (19%)—were determined to be negative by the ELISA. No statistical differences in absorbance were seen between the different clinical forms.

Analysis of antifungal therapy on antibody profile. The 35 patients with sporotrichosis receiving itraconazole produced antibody at sufficient levels to be detected by at least one of the isotype ELISAs. Twenty-two (62.9%) were positive for IgG, IgM, and IgA, nine (25.7%) had two detectable isotypes, and four (11.4%) had one positive isotype. Figure 2 compares the OD values of sporotrichosis patients before and during antifungal therapy. There were significant differences ($P < 0.001$) between the mean ODs of IgM and IgA responses between patients not yet treated (0.79 ± 0.09 and 0.926 ± 0.102 , respectively) and those receiving itraconazole (0.42 ± 0.04 and 0.47 ± 0.04 , respectively). Although there was a decrease in the OD mean for IgG antibody detection between the two groups (1.28 ± 0.13 prior to treatment and 0.95 ± 0.10 on itraconazole), this difference was not statistically different. Analysis of antifungal therapy on antibody isotype responses in each of the clinical forms of sporotrichosis studied is shown in Table 1. Significant decreases in IgM and IgA levels were observed for the fixed cutaneous and lymphocutaneous forms of sporotrichosis between the patients prior to treatment compared to those on therapy. No statistical differences were observed in the clinical forms by IgG antibody levels or for IgM and IgA responses in disseminated cutaneous and extracutaneous sporotrichosis. In order to assess the relationship between length of antifungal therapy and antibody levels, we studied the correlation between these two variables (Fig. 3). A general decrease in levels during treatment time could be observed with each isotype, but the correlation was only significant for IgG and IgM, with P values of 0.004, 0.0160, and 0.074 for IgG, IgM, and IgA, respectively.

Cross-reactions. Cross-reactions between IgG, IgM, and IgA antibodies present in sera from patients with other infectious diseases and in sera from normal subjects are shown in Fig. 4. There were more cross-reactions with the mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens with IgM than the other isotypes. A total of 21 sera (22% of total heterologous sera) had

detectable IgM in our assay. Of these, 2 were collected from patients with histoplasmosis (2 of 13 [15%]), 3 were from patients with tuberculosis (3 of 12 [25%]), 9 were from patients with leishmaniasis (9 of 18 [50%]), 1 was from a patient with aspergillosis (1 of 4 [25%]), 1 was from a patient with paracoccidioidomycosis (1 of 12 [8%]), and 5 were from normal subjects (5 of 26 [19%]). None of the tested patients infected with *Cryptococcus neoformans* had positive IgM or IgG tests. Cross-reactions were observed in 11 heterologous sera tested for IgG response against *S. schenckii* exoantigens. These positive reactions were observed in three sera from patients with histoplasmosis (3 of 13 [23%]), 2 were from patients with tuberculosis (2 of 12 [17%]), 3 were from patients with leishmaniasis (3 of 18 [17%]), 1 was from a patient with aspergillosis (1 of 4 [25%]), another was from a patient with paracoccidioidomycosis (1 of 12 [8%]), and one was a normal subject (1 of 26, 4%). IgA was the isotype with the least cross-reactions, which occurred in 8 sera from individuals with histoplasmosis (3 of 13 sera [23%]), leishmaniasis (2 of 18 sera [11%]), paracoccidioidomycosis (2 of 12 sera [17%]), and cryptococcosis (1 of 9 sera [11%]). Despite these cross-reactive test results for IgA, the mean OD value for each disease studied and for the normal subject group was statistically lower than the mean OD from patients with sporotrichosis before antifungal ther-

TABLE 1. ELISA results of IgG, IgM, and IgA responses against mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens in patients with different clinical forms of sporotrichosis

Antibody isotype	Clinical form ^a	Absorbance (mean \pm SD)		P^b
		Before treatment	During treatment	
IgG	FC	1.212 \pm 0.2839	0.9828 \pm 0.1647	0.4645
	LC	1.112 \pm 0.2255	0.7996 \pm 0.1269	0.2071
	DC	1.416 \pm 0.2193	0.9376 \pm 0.2080	0.2739
	EC	1.319 \pm 0.3780	2.015 \pm 1.001	0.4375
IgM	FC	0.9507 \pm 0.2087	0.3742 \pm 0.05177	0.0049
	LC	0.8296 \pm 0.1639	0.3317 \pm 0.03616	0.0017
	DC	0.7190 \pm 0.1469	0.6656 \pm 0.1345	0.8529
	EC	0.7243 \pm 0.1560	0.8685 \pm 0.4750	0.7071
IgA	FC	1.327 \pm 0.2516	0.5356 \pm 0.08671	0.0028
	LC	0.7783 \pm 0.1305	0.3933 \pm 0.04230	0.0034
	DC	0.8770 \pm 0.1853	0.4459 \pm 0.1165	0.2358
	EC	0.7769 \pm 0.1836	0.6885 \pm 0.06200	0.7863

^a FC, fixed cutaneous; LC, lymphocutaneous; DC, disseminated cutaneous; EC, extracutaneous.

^b The P value was calculated by using the unpaired Student t test.

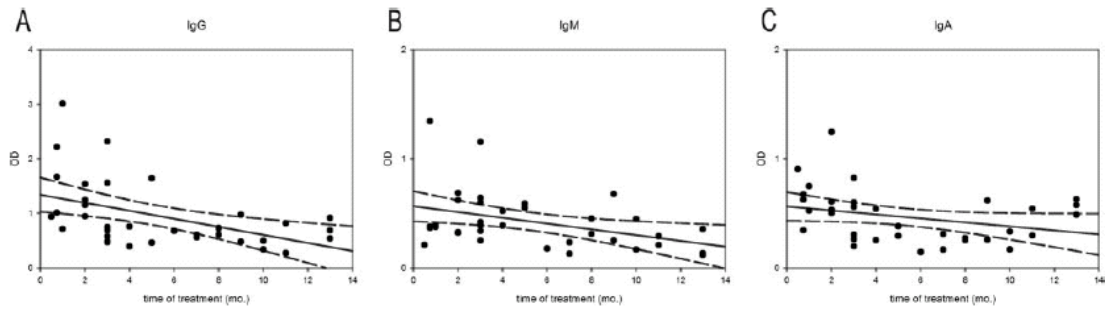


FIG. 3. Correlation between time of treatment and levels of IgG (A), IgM (B), and IgA (C) in sera from patients with sporotrichosis. Dashed lines indicate the 95% confidence interval for the linear regression (continuous line) of values.

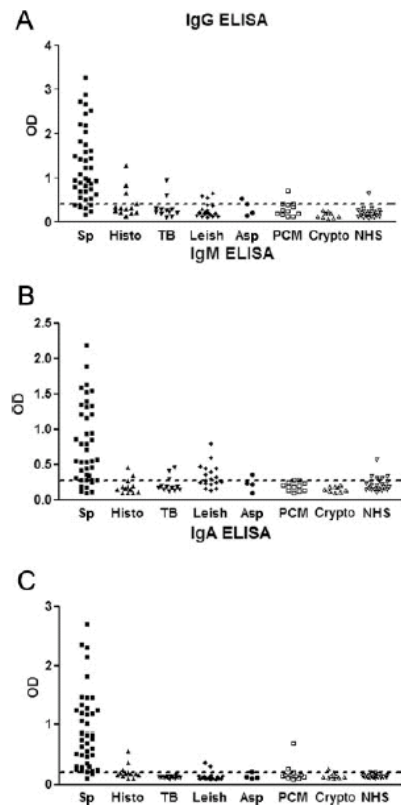


FIG. 4. Cross-reactions observed in IgG (A), IgM (B), and IgA (C) ELISAs using mycelial-phase *S. schenckii* exoantigens. Cross-reactions were studied in 94 sera from patients with histoplasmosis (Histo), tuberculosis (TB), leishmaniasis (Leish), aspergillosis (Asp), paracoccidioidomycosis (PCM), and cryptococcosis (Crypto) and with sera from normal human subjects (NHS). Dashed lines indicate the cutoff values for each ELISA. Samples above the cutoff were considered positive.

apy. All sera from normal subjects and patients with tuberculosis or aspergillosis were determined to be negative by the IgA assay.

Comparison between ELISA tests. In order to compare the three immunoassays described, ROC curves were constructed by using the OD values of patients without treatment and the area under each curve was compared. Table 2 reveals that the area under the curve results were IgA > IgG > IgM. According to Greiner et al. (22), the values obtained for the areas under the curves shown in Table 2 classify the IgG and IgA ELISAs as highly accurate tests and the IgM ELISA as a moderately accurate test for the serodiagnosis of sporotrichosis. In addition, we also compared absorbance readings with the three ELISAs as a measure of specific antibody titers for each patient with sporotrichosis without treatment to test for correlation between the levels of different isotypes (Fig. 5). We found positive correlations for all comparisons (IgG and IgM, $r = 0.53$; IgG and IgA, $r = 0.67$; IgM and IgA, $r = 0.59$), and analysis of variance showed a positive correlation in each instance ($P < 0.05$ for all analyses).

Application of specific IgG, IgM, and IgA detection in the serodiagnosis of sporotrichosis. Table 3 shows the parameters obtained for each single ELISA. As suggested by the ROC curve analysis, the best results were obtained for IgA isotype detection, with a sensitivity of 95.1%, a specificity of 91.5%, and an efficiency of 92.6%. In order to check whether the combination of results from two or three assays could improve diagnosis, we repeated the analysis considering as "positive" a serum sample with positive results in two specific isotypes, in all three isotypes tested, and in at least two isotypes. The results of this analysis are shown in Table 4. We observed a general increase in specificity in all cases due to the fact that

TABLE 2. Area under ROC curves for IgG, IgM, and IgA antibody detection in sporotrichosis

Antibody class	Area	SE	Asymptotic 95% confidence interval	
			Lower bound	Upper bound
IgG	0.936	0.023	0.890	0.982
IgM	0.856	0.042	0.774	0.939
IgA	0.957	0.022	0.913	1.001

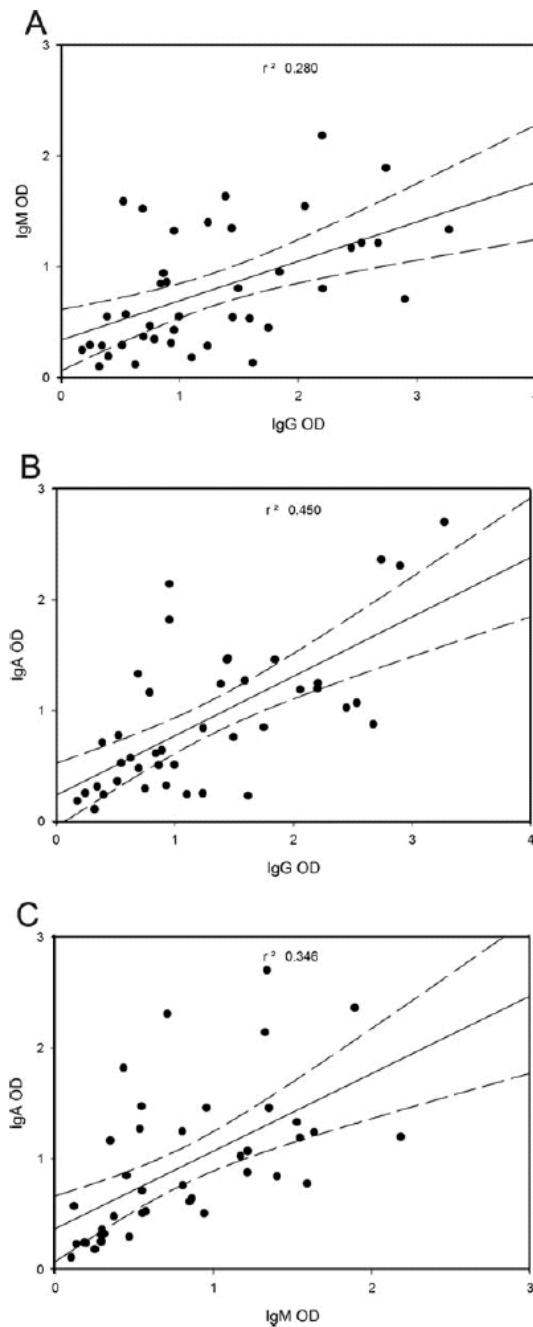


FIG. 5. Correlation between the antibody levels of different isotypes in each patient with sporotrichosis. The OD values for one ELISA were plotted versus the OD values of another ELISA to detect another isotype. The linear regression line in the middle is bracketed by two dashed lines, which indicate the 95% confidence interval. R^2 values were calculated for each comparison by using SigmaPlot 2000. (A) Comparison between IgG

and IgM levels; (B) comparison between IgG and IgA levels; (C) comparison between IgM and IgA levels.

heterologous sera typically cross-reacted in only one of the *S. schenckii* exoantigen ELISA (23 of 31 cross-reactive sera [74.2%]). When a serum sample was categorized as "positive" upon reactivity against the *S. schenckii* mycelial exoantigens in two or three isotype ELISAs, the combined assay achieved 92.7% sensitivity and 91.5% specificity, with an efficiency of 91.9%.

DISCUSSION

Sporotrichosis is a cosmopolitan disease and is considered the most prevalent subcutaneous mycosis in Latin America (18). The gold standard method for the diagnosis of sporotrichosis is culture, but the time necessary for fungal growth and identification can be up to 3 weeks. In addition, in cases of extracutaneous disease, collection of clinical specimens may be difficult, requiring invasive procedures. Obtaining clinical specimens is also not possible in cases of spontaneous regression of lesions. As a consequence, the establishment of serological methods for diagnosis and follow-up of therapy in sporotrichosis is urgently needed.

Historically, antibody response against *S. schenckii* antigens has been detected by using agglutination or immunoprecipitation assays (2, 10, 15, 28, 29, 33, 47); these assays do not allow differentiation among different antibody isotypes in the humoral immune response against this dimorphic fungus. More recently, ELISA-based tests have been used to study antibodies produced in sporotrichosis (9, 39, 43). In contrast to the present study, prior investigations only assayed for IgG isotype responses. However, antibodies of different isotypes can participate in the defense of a host against pathogenic fungi (17, 38, 41). Although murine data suggest that there are differences in isotype responses to sporotrichosis (36), there is no detailed information about humoral immune response in human disease. As with many microorganisms, not all individuals in areas of endemicity exposed to the fungus will develop disease, but they may develop a specific humoral response (5, 21). Because of the lack of knowledge about antibodies produced in sporotrichosis we decided to study IgG, IgM, and IgA responses in the sera of patients with sporotrichosis against the exoantigens produced by this fungus in its infective form.

The majority of our patients with sporotrichosis had antibodies of IgG, IgM, and IgA classes against mycelial-phase exoantigens of *S. schenckii* on presentation to our clinic, and reactivity persisted during the treatment of the disease, with a trend toward lower reactivity with increasing length of time on therapy. To our knowledge, this is the first report of IgM and IgA antibodies in human sporotrichosis. These two classes of antibodies potentially have important roles in the pathogenesis of the disease. It has been shown that *S. schenckii* can activate complement by the alternate pathway and that classical activation cannot be excluded (44). IgM antibodies especially can have a role in the activation of complement by the classical pathway and have been shown to activate complement in several mycotic diseases (30). Mucosal involvement can occur in

TABLE 3. Serological parameters of ELISA tests to detect IgG, IgM, and IgA against *S. schenckii* exoantigens in the serodiagnosis of sporotrichosis^a

Immunoglobulin	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Efficiency (%)	PPV (%)	NPV (%)	Likelihood ratio	
						Positive	Negative
IgG	85.4	87.2	87.4	76.1	93.3	7.2949	0.1657
IgM	85.4	77.7	80.0	62.5	92.4	3.8211	0.1884
IgA	95.1	91.5	92.6	83.0	97.7	11.1768	0.0533

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

sporotrichosis (7, 16, 25, 31, 42) and, in this context, IgA might represent an important mechanism of defense. It is interesting that IgM and IgA antibodies remain at detectable levels in the majority of patients undergoing itraconazole treatment, although the levels differ depending on the clinical form of the patient. Patients with fixed cutaneous and lymphocutaneous sporotrichosis had lower OD values while receiving itraconazole. However, no difference was seen in the mean OD values of IgM and IgA in patients with disseminated cutaneous and extracutaneous sporotrichosis, before and during therapy. This could be due to a higher fungal burden in these patients, leading to continuous antigen presentation and antibody production, especially for IgM antibodies. Most *S. schenckii* antigens are glycosylated (31), and the glycosidic moieties could evoke an IgM response. Although the percentage of patients with detectable levels of IgG antibodies increased in the group of patients receiving itraconazole, their mean OD levels did not show a significant decrease for any of the clinical forms studied, which could be due to the long half-life of IgG antibodies. However, this isotype, as well as IgM, appears to decrease in sera during treatment, and they can be used as a marker to study the clinical efficacy of antifungal therapy. Since disseminated cutaneous and extracutaneous sporotrichosis are not common forms of the disease, we did not have a large number of sera from such patients, especially during itraconazole therapy. Hence, it is important to study a larger number of sera from patients with these clinical forms to validate our hypothesis. In fact, we are now studying the antibody response of patients from diagnosis through treatment to better validate the use of these ELISAs in the follow-up of patients after treatment with itraconazole and other drugs.

Cross-reactions between fungal antigens have been described in several different studies (9, 12, 27, 28, 35, 49, 51), and some of them show that *S. schenckii* cross-reacts against several fungi and some bacteria (27, 28, 35, 48). We observed that 33% of sera from individuals without sporotrichosis were positive by at least one of our isotype ELISAs. Of the cross-reactive sera, 74.2% of them had only one positive antibody isotype, which

we postulate occurred because of similarities between fungal or other microbial antigens instead of previous contact with *S. schenckii*, since only 2.6% of seroreactive patients with sporotrichosis had only one positive isotype. Even during treatment, patients with sporotrichosis typically were positive by at least two antibody class ELISAs. However, for the other 25.8% of individuals without sporotrichosis and with serological reactivity against *S. schenckii* exoantigens, especially one patient with histoplasmosis that was positive in all three assays, the possibility of previous contact with *S. schenckii* could not be discarded, since our patients live in the metropolitan area of Rio de Janeiro, a region where sporotrichosis is endemic (7, 31).

American tegumentary leishmaniasis is a vector-borne disease caused in Brazil mainly by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, an intracellular pathogen. This unique *Leishmania* species can cause a spectrum of clinical presentation ranging from self-healing or benign cutaneous lesions to more severe forms, such as mucosal leishmaniasis. This disease had a higher level of cross-reactivity with the *S. schenckii* antigens. Although *Leishmania-S. schenckii* coinfection can occur (1), it is an unusual finding, since the routes of transmission for these two diseases are distinct. Cross-reactivity is seen in patients with sporotrichosis when subjected to the Montenegro skin test (6), and our results show a broad cross-reaction range in patients with leishmaniasis and *S. schenckii* exoantigens. For this reason, it is necessary to study more specific antigens and/or identify specific epitopes on available antigens to improve the differential serodiagnosis of these diseases that share some clinical characteristics but that have distinct therapeutic conducts.

Serodiagnosis of sporotrichosis by ELISA is a challenging problem, especially in terms of specificity (9). The increasing awareness of this disease, along with life-threatening disease that may occur in immunocompromised patients (26) and diagnostic challenges, in particular with this latter group of patients, provides a strong rationale for pursuing improved methods of diagnosis. Our previous work on IgG detection in sera from patients with sporotrichosis showed a higher sensitivity

TABLE 4. Combination of ELISA test results in the serodiagnosis of sporotrichosis^a

Isotypes	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Efficiency (%)	PPV (%)	NPV (%)
IgG and IgM positive	78.0	95.7	90.4	88.9	90.9
IgG and IgA positive	85.4	97.9	94.1	94.6	93.9
IgM and IgA positive	85.4	95.7	92.6	89.7	93.8
At least two positive isotypes ^b	92.7	91.5	91.9	82.6	96.6
IgG, IgM, and IgA positive	78.0	98.9	92.6	97.0	91.2

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

^b In this case, a positive sample was considered when the OD values for two isotypes were above the cutoff value, not regarding which isotype was positive.

value than the one found in the present study. This difference can be explained by some alterations such as different 96-well microtiter plates and conjugate that we introduced in the ELISAs described here in order to allow for IgM and IgA detection. Another factor for the observed disparity can be the different sera used in these studies. Since all sera were randomly selected, some of our sera were collected in the very beginning of the disease, potentially before the immune system could effectively produce specific immunoglobulins. One observation that supports this thesis is that three patients with a negative IgG serology had detectable levels of IgM antibodies. However, ROC curves in both studies present similar areas under the curve (higher than 0.9), indicating that the assays are very accurate tests for sporotrichosis serodiagnosis. In the present study, we noticed specificity values ranging from 77.7 to 91.5%, depending on which isotype was being detected. However, when we combined the results from the three ELISAs, an increase in specificity was observed, particularly when we considered serum samples that had positive results in at least two different isotypes to represent a positive test result. This is significant, since no specific immunological test is commercially available. In conclusion, we strongly suggest that in the serodiagnosis of sporotrichosis that IgG, IgM, and IgA isotypes have to be tested and a combination of results be utilized in order to provide the most accurate result. Finally, it is important to note that serodiagnosis tests in sporotrichosis do not provide a definitive diagnosis; they are conjunctive tools for the diagnosis of this infection. The results must be interpreted according to the clinical findings and the eco-epidemiologic history of the patient.

ACKNOWLEDGMENTS

R.A.-P. was supported in part by an Interhemispheric Research Training Grant in Infectious Diseases, Fogarty International Center (NIH D43-TW007129). J.D.N. is supported in part by NIH AI52733 and AI056070-01A2, a Wyeth Vaccine Young Investigator Research Award from the Infectious Disease Society of America, and the Center for AIDS Research at the Albert Einstein College of Medicine and Montefiore Medical Center (NIH AI-51519). R.M.Z.-O. is in part supported by CNPq 306288/2006-0.

We thank Armando de Oliveira Schubach and Maria Clara Gutierrez Galhardo for providing clinical information about the patients included in this study.

REFERENCES

- Agudelo, S. P., S. Restrepo, and I. D. Velez. 1999. Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 40:1002-1004.
- Albornoz, M. B., E. Villanueva, and E. D. Torres. 1984. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia* 85:177-183.
- Almeida-Paes, R., M. A. Pimenta, C. V. Pizzini, P. C. Monteiro, J. M. Peralta, J. D. Nosanchuk, and R. M. Zanco-Oliveira. 2007. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:244-249.
- Araujo, T., A. C. Marques, and F. Kerdel. 2001. Sporotrichosis. *Int. J. Dermatol.* 40:737-742.
- Baida, H., P. J. Biselli, M. Juvenale, G. M. Del Negro, M. J. Mendes-Giannini, A. J. Duarte, and G. Benard. 1999. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1:273-278.
- Barros, M. B. L., A. O. Schubach, A. C. Francesconi-do-Valle, M. C. Gutierrez-Galhardo, T. M. Schubach, F. Conceicao-Silva, M. de Matos Salgueiro, E. Mouta-Confort, R. S. Reis, M. Fatima Madeira, T. Cuzzi, L. P. Quintella, J. P. Silva Passos, M. J. Conceicao, and M. C. A. Marzochi. 2005. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop.* 93:41-47.
- Barros, M. B. L., A. O. Schubach, M. C. Galhardo, T. M. Schubach, R. S. dos Reis, M. J. Conceicao, and A. C. F. Valle. 2003. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Dermatol.* 42:677-681.
- Barros, M. B. L., T. M. Schubach, M. C. Galhardo, A. O. Schubach, P. C. Monteiro, R. S. Reis, R. M. Zanco-Oliveira, M. S. Lazera, T. Cuzzi-Maya, T. C. Blanco, K. B. Marzochi, B. Wanke, and A. C. F. Valle. 2001. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96:777-779.
- Bernardes-Engemann, A. R., R. C. Costa, B. R. Miguens, C. V. Penha, E. Neves, B. A. Pereira, C. M. Dias, M. Mattos, M. C. Gutierrez, A. Schubach, M. P. Oliveira Neto, M. Lazera, and L. M. Lopes-Bezerra. 2005. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 43:487-493.
- Blumer, S. O., L. Kaufman, W. Kaplan, D. W. McLaughlin, and D. E. Kraft. 1973. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. *Appl. Microbiol.* 26:4-8.
- Bueno, J. P., M. J. Mendes-Giannini, G. M. Del Negro, C. M. Assis, C. K. Takiguti, and M. A. Shikanai-Yasuda. 1997. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J. Med. Vet. Mycol.* 38:213-217.
- Camargo, Z. P., R. G. Baruzzi, S. M. Maeda, and M. C. Floriano. 1998. Antigenic relationship between *Loboia lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. *Med. Mycol.* 36:413-417.
- Casadevall, A. 1995. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun.* 63:4211-4218.
- Casadevall, A., and L. A. Pirofski. 2006. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv. Immunol.* 91:1-44.
- Casserone, S., I. A. Conti-Diaz, E. Zanetta, and M. E. P. Pereira. 1983. Serologia de la esporotrichosis cutánea. *Sabouraudia* 21:317-321.
- Castro, R. M., M. F. Sabogal, L. C. Cuce, and A. Salebian. 1981. Disseminate sporotrichosis: report of a clinical case with mucocutaneous, osteo-articular, and ocular lesions. *Mykosen* 24:92-96.
- Chaturvedi, A. K., A. Kavishwar, G. B. Shiva Keshava, and P. K. Shukla. 2005. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12:1063-1068.
- Conti Diaz, I. A. 1989. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia* 108:113-116.
- Dixon, D. M., I. F. Salkin, R. A. Duncan, N. J. Hurd, J. H. Haines, M. E. Kenna, and F. B. Coles. 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:1106-1113.
- Esterre, P., M. Jahevitra, and A. Andriantsimahavandy. 2000. Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:497-500.
- Esterre, P., M. Jahevitra, E. Ramarcel, and A. Andriantsimahavandy. 1997. Evaluation of the ELISA technique for the diagnosis and the seroepidemiology of chromoblastomycosis. *J. Mycol. Med.* 7:137-141.
- Greiner, M., D. Pfeiffer, and R. D. Smith. 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45:23-41.
- Greiner, M., D. Sohr, and P. Gobel. 1995. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods* 185:123-132.
- Hamouda, T., C. D. Jeffries, E. M. Ekladios, A. M. el-Mishad, M. el-Koomy, and N. Saleh. 1994. Class-specific antibody in human dermatophytosis reactive with *Trichophyton rubrum* derived antigen. *Mycopathologia* 127:83-88.
- Hampton, D. E., A. Adestina, and J. Chodosh. 2002. Conjunctival sporotrichosis in the absence of antecedent trauma. *Cornea* 21:831-833.
- Hardman, S., I. Stephenson, D. R. Jenkins, M. J. Wiselka, and E. M. Johnson. 2005. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. *J. Infect.* 51:73-77.
- Ishizaki, H., Y. Nakamura, and R. W. Wheat. 1981. Serological cross-reactivity between *Sporothrix schenckii* and various unrelated fungi. *Mycopathologia* 73:65-68.
- Ishizaki, H., R. W. Wheat, D. P. Kiel, and N. F. Conant. 1978. Serological cross-reactivity among *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis*, *Europhium*, and *Graphium* species. *Infect. Immun.* 21:585-593.
- Karlin, J. V., and H. S. Nielsen, Jr. 1970. Serologic aspects of sporotrichosis. *J. Infect. Dis.* 121:316-327.
- Kozel, T. R. 1996. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:34-46.
- Lopes-Bezerra, L. M., A. O. Schubach, and R. O. Costa. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78:293-308.
- Manhart, J. W., J. A. Wilson, and B. C. Korbitz. 1970. Articular and cutaneous sporotrichosis. *JAMA* 214:365-367.
- Mendoza, M., A. M. Diaz, M. B. Hung, E. A. Zambrano, E. Diaz, and M. C. Albornoz. 2002. Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. *Med. Mycol.* 40:447-454.

34. Morris-Jones, R. 2002. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 27:427-431.
35. Nakamura, Y., H. Ishizaki, and R. W. Wheat. 1977. Serological cross-reactivity between group B *Streptococcus* and *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis* species, and *Graphium* species. *Infect. Immun.* 16:547-549.
36. Nascimento, R. C., and S. R. Almeida. 2005. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43:241-247.
37. Nosanchuk, J. D. 2005. Protective antibodies and endemic dimorphic fungi. *Curr. Mol. Med.* 5:435-442.
38. Nosanchuk, J. D., J. N. Steenbergen, L. Shi, G. S. Deepe, Jr., and A. Casadevall. 2003. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Investig.* 112:1164-1175.
39. Penha, C. V., and L. M. Bezerra. 2000. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. *Med. Mycol.* 38:1-7.
40. Pirofski, L. A., and A. Casadevall. 1996. *Cryptococcus neoformans*: paradigm for the role of antibody immunity against fungi? *Zentbl. Bakteriol.* 284:475-495.
41. Rivera, J., and A. Casadevall. 2005. Mouse genetic background is a major determinant of isotype-related differences for antibody-mediated protective efficacy against *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 174:8017-8026.
42. Schubach, A., M. B. de Lima Barros, T. M. Schubach, A. C. Francesconi-Valle, M. C. Gutierrez-Galhardo, M. Sued, M. de Matos Salgueiro, P. C. Fialho-Monteiro, R. S. Reis, K. B. Marzochi, B. Wanke, and F. Conceicao-Silva. 2005. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea* 24:491-493.
43. Scott, E. N., and H. G. Muchmore. 1989. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 27:300-304.
44. Scott, E. N., H. G. Muchmore, and D. P. Fine. 1986. Activation of the alternative complement pathway by *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 51:6-9.
45. Silva-Vergara, M. L., F. R. Maneira, R. M. Oliveira, C. T. Santos, R. M. Etchebere, and S. J. Adad. 2005. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. *Med. Mycol.* 43:187-190.
46. Silva, V., O. Fischman, and Z. P. Camargo. 1997. Humoral immune response to *Malassezia furfur* in patients with pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis. *Mycopathologia* 139:79-85.
47. Smith, P. W., G. W. Loomis, J. L. Luckasen, and R. K. Osterholm. 1981. Disseminated cutaneous sporotrichosis: three illustrative cases. *Arch. Dermatol.* 117:143-144.
48. Takata, M., and H. Ishizaki. 1983. Correlations among culture times, sugar composition and biological activities of *Sporothrix schenckii* antigens. *Mycopathologia* 84:31-39.
49. Valle, A. C. F., R. L. Costa, P. C. Fialho Monteiro, J. Von Helder, M. M. Muniz, and R. M. Zancope-Oliveira. 2001. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* 39:373-377.
50. van de Sande, W. W., D. J. Janse, V. Hira, H. Goedhart, R. van der Zee, A. O. Ahmed, A. Ott, H. Verbrugh, and A. van Belkum. 2006. Translationally controlled tumor protein from *Madurella mycetomatis*, a marker for tumorous mycetoma progression. *J. Immunol.* 177:1997-2005.
51. Zancope-Oliveira, R. M., S. L. Bragg, E. Reiss, B. Wanke, and J. M. Peralta. 1994. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:390-393.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)