

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

MONIQUE AMORIM PIMENTA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL ATRAVÉS DE
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) NA
ESPOROTRICOSE**

Rio de Janeiro

2009

Avaliação clínico-laboratorial através de ensaio
imunoenzimático (ELISA) na esporotricose

MONIQUE AMORIM PIMENTA

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências.

Orientadoras: Prof^ª Dr^ª Rosely Maria

Rio de janeiro

2009

MONIQUE AMORIM PIMENTA

Avaliação clínico-laboratorial através de ensaio imunoenzimático
(ELISA) na esporotricose.

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Curso de
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro

Orientadoras: Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira e da Dr^a. Maria Clara Gutierrez Galhardo.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antônio Carlos Francesconi do Valle - IPEC/FIOCRUZ (Presidente)

Dr. Francisco Inácio P.M. Bastos - ICICT/FIOCRUZ (Membro)

Dr^a. Regina Helena Saramago Peralta - UFF (Membro)

Dr. José Mauro Peralta – UFRJ (Suplente)

Aos meus pais, Ubiraci e Terezinha, por toda
dedicação e amizade ao longo
desses anos de minha existência,
razão única da minha vida
e deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pela oportunidade fornecida aos alunos de um curso de pós graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

À Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira, por acreditar no meu potencial, pela orientação e paciência dedicada a mim por todos esses anos.

À Dr^a. Maria Clara Gutierrez Galhardo, pela orientação e indicações de caminhos concedidas a mim nesta trajetória, mas acima de tudo pelo carinho e palavras amiga de incentivo.

Ao Rodrigo de Almeida Paes, pela grande amizade, paciência e por toda a ajuda e dicas no preparo deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Cezar Fialho Monteiro, por ter me dado à oportunidade de ingressar no mundo da Micologia, pela amizade e conselhos dedicados a mim ao longo desses oito anos.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Setor de Diagnóstico Micológico: Fábio, Renata, Tailana, Mônica, Glayde, Rosani e Maria Helena pela amizade e agradáveis momentos de convívio.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Setor de Imunodiagnóstico: André, Karla, Priscila, Mauro, Marcos e Manoel, pela ajuda e pelos agradáveis momentos de convívio.

As amigas da turma do mestrado: Flávia, Luanda e Bernardina pelo incentivo e valiosa amizade.

A Neilane Bertoni pela ajuda espetacular nas análises estatísticas e pelas ótimas sugestões concedidas a mim para realização deste trabalho.

"É importante fazer o que se gosta.
É melhor ainda gostar do que se faz,
e só se arrepender
dos riscos não encarados"

Érico Veríssimo

Pimenta, M. A. **Avaliação clínico-laboratorial através de ensaio imunoenzimático (ELISA) na esporotricose.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A esporotricose é a micose subcutânea mais freqüente no Brasil. O diagnóstico definitivo dessa doença se dá com o isolamento em cultivo do fungo, o que em algumas vezes não é possível. Portanto, o desenvolvimento de métodos sorológicos que venham auxiliar no diagnóstico da esporotricose e na avaliação terapêutica dos pacientes é de grande interesse. No presente estudo foi empregada uma técnica imunológica aplicada à detecção de anticorpos em soro, no formato de ELISA, em pacientes com esporotricose cutânea confirmada por isolamento do fungo (n=58), assim como em pacientes com indicação clínico-epidemiológica de esporotricose, mas sem isolamento do fungo em cultivo (n=23). A avaliação da especificidade da técnica foi feita utilizando-se soros heterólogos. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 98% para ensaios de detecção de IgG e de 99% para ensaios de detecção de IgM, e a especificidade de ambos os testes foi de 89%. Reações cruzadas foram observadas, da mesma forma como em outros imunoenaios para o diagnóstico da esporotricose. Foram colhidas três amostras de soro, uma no momento do diagnóstico (tempo 1), uma três a seis meses após o início da micose (tempo 2) e uma de nove a 12 meses após início da micose (tempo 3). A avaliação dos anticorpos ao longo do tratamento mostra que na forma fixa da doença não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, tanto nos ensaios de IgG como de IgM. Apenas nos ensaios do grupo de pacientes com forma linfocutânea, observou uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos 2 [1,498 (IIQ: 1,026-2,009)] e tempo 3 [1,398 (IIQ: 0,925-1,678)] com $p=0,004$ nos ensaio de IgG e uma diferença entre os tempos 1 [1,263 (IIQ: 0,639-1,658)] e tempo 2 [1,015 (IIQ: 0,511-1,336)], tempos 2 e 3 [0,853 (IIQ: 0,453-1,173)] e tempos 1 e 3 nos ensaios de detecção de IgM. Paralelamente foram analisados também, soros de 15 pacientes com infecção pelo HIV e esporotricose de diferentes formas clínicas nos quais a técnica de ELISA mostrou uma sensibilidade de 90% nos ensaios de detecção de IgG e sensibilidade de 80% nos ensaios de detecção de IgM. Concluímos que a técnica de ELISA pode ser utilizada como ferramenta de auxílio diagnóstico para pacientes com esporotricose e para pacientes com esporotricose infectados pelo HIV. Um maior tempo de acompanhamento de pacientes é necessário para melhor se estabelecer a importância da detecção de anticorpos como critério de cura da esporotricose. A técnica de ELISA é uma excelente ferramenta diagnóstica para pacientes de esporotricose sem confirmação micológica.

Palavras-chave: 1. Esporotricose. 2. Diagnóstico. 3. ELISA.

Pimenta, M. A. **Clinical and laboratory evaluation by enzyme immunoassay (ELISA) in sporotrichosis**. Rio de Janeiro, 2009. Master [Science dissertation in Clinic research in infectious Disease] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

The sporotrichosis is the most common subcutaneous mycosis in Brazil. The definitive diagnosis of this disease occurs in isolation with the fungal culture, which some times is not possible. Therefore, the development of serological methods that may assist in the diagnosis of sporotrichosis and in evaluating treatment of patients is of great interest. In the present study employed a technique applied to the detection of immune antibodies in serum, the ELISA format, in patients with cutaneous sporotrichosis confirmed by isolation of the fungus (n = 58) and in patients with clinical and epidemiological aspects of sporotrichosis, but without isolation of the fungus in culture (n = 23). The evaluation of the specificity of the technique was performed using heterologous sera. The results showed a sensitivity of 98% for testing the detection of IgG and 99% for testing the detection of IgM, and specificity of both tests was 89%. Cross-reactions were observed in the same way as in other immunoassays for the diagnosis of sporotrichosis. Were harvested three serum samples, one at the time of diagnosis (time 1), a three to six months after the onset of mycosis (time 2) and one of nine to 12 months after onset of mycosis (time 3). Evaluation of antibodies during the treatment shows that the fixed form of the disease shows no statistically significant differences in both tests for IgG and IgM. Only the tests of the group of patients with linfocutânea way, was a statistically significant difference between the time 2 [1498 (IQR: 1026-2009)] and time 3 [1398 (IQR: 0925-1678)] with $p = 0004$ in the testing of IgG and a difference between times 1 [1263 (IQR: 0639-1658)] and time 2 [1015 (IQR: 0511-1336)], times 2 and 3 [0853 (IQR: 0453-1173)] and days 1 and 3 in tests for detection of IgM. At was also studied, sera from 15 patients with HIV infection and different clinical forms of sporotrichosis which the technique of ELISA showed a sensitivity of 90% in tests for detection of IgG and sensitivity of 80% in tests for IgM detção. We conclude that the ELISA technique could be used as a tool to aid diagnosis in patients with sporotrichosis and sporotrichosis patients with HIV. A longer follow-up of patients is needed to better establish the importance of detection of antibodies as a criterion for cure of sporotrichosis. The technique of ELISA is an excellent diagnostic tool for patients with sporotrichosis without mycological confirmation.

Keywords: 1. Esporotricose. 2. Diagnóstico. 3. ELISA.

INDICE

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. ESTADO DE ARTE.....	5
2.1. Histórico.....	5
2.2. O patógeno.....	5
2.3. Patogenia da esporotricose.....	6
2.3.1 Patogenia da esporotricose em humanos.....	6
2.3.2 Patogenia da esporotricose em gatos.....	8
2.4. Prováveis fatores de virulência.....	9
2.5. Resposta imune na esporotricose.....	11
2.6. Epidemiologia.....	13
2.7. Diagnóstico laboratorial.....	14
3. RELEVÂNCIA.....	17
4. OBJETIVO GERAL.....	19
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
6.1. Amostragem.....	20
6.1.1. Avaliação clínico-laboratorial do ELISA em pacientes com esporotricose cutânea.....	20
6.1.2. Avaliação clínico-laboratorial da ELISA em pacientes com esporotricose infectados pelo HIV.....	22
6.1.3. Amostras de soros controle e heterólogos.....	22
6.2 Cepa.....	23
6.3. Obtenção do exoantígeno.....	23
6.4. Dosagem de proteínas.....	23
6.5. ELISA.....	24
6.6. Análise epidemiológica e estatística.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1. Produção do exoantígeno.....	27
7.2 Curvas TG-ROC e determinação do cutoff.....	27
7.3. Avaliação clínica e epidemiológica dos pacientes.....	28
7.4. Reatividade cruzada no ensaio.....	30

7.5. Níveis de anticorpos ao longo do tratamento	33
7.5.1. Pacientes com diagnóstico clínico de esporotricose e confirmado por exame micológico.....	33
7.5.2. Pacientes com indicação clínica e epidemiológica de esporotricose com exame micológico negativo.	41
7.6. Detecção de anticorpos nos soros de pacientes com esporotricose infectados pelo HIV.....	43
7.6.1. Análise estatística dos dados	44
8. DISCUSSÃO	47
9. CONCLUSÃO.....	54
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
11. APÊNDICES	65

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção de evolução subaguda ou crônica do ser humano e de outros animais causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, que vive saprofiticamente em vegetais, vivos ou em decomposição, e no solo. A transmissão, na maioria das vezes, se dá através da inoculação traumática do *S. schenckii* na pele por materiais contaminados. Alguns animais têm sido relacionados à transmissão zoonótica da esporotricose, em especial gatos domésticos, onde a incidência desta forma de transmissão tem se mostrado alta no estado do Rio de Janeiro (Schubach et al. 2008, Schubach et al. 2005 e Schubach et al. 2001b). A transmissão da doença é quatro vezes maior em pacientes que cuidam de gatos (Barros et al. 2008b). Os fatores mais relacionados à virulência do *S. schenckii* são a termotolerância, a capacidade de produção de melanina e a capacidade de adesão e invasão (Mesa-Arango et al. 2002; Figueredo et al. 2007).

Os mecanismos imunológicos envolvidos no controle desta infecção ainda não estão muito bem elucidados. Na resposta imune celular participam macrófagos e linfócitos T CD4+ (Tachibana et al. 1999). Quanto à resposta imune humoral já foram caracterizados alguns determinantes antigênicos, como ramnose e peptidoraminomanana (Lopes et al. 1994) e alguns isotipos de imunoglobulinas como, por exemplo, IgG, IgM e IgA, que estão envolvidos na resposta a exoantígenos do fungo (Almeida-Paes et al. 2007b). A esporotricose, na maioria das vezes, é uma infecção benigna limitada à pele e tecido celular subcutâneo, mas que, em raras situações, pode apresentar quadros de disseminação. No homem, a forma cutânea ocorre em até 95% dos casos. As formas extracutâneas são menos freqüentes, ocorrendo especialmente em indivíduos imunocomprometidos com neoplasia, uso de imunossuppressores, infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou com doença debilitante como alcoolismo, diabetes, doença obstrutiva crônica entre outras. Nestes casos, a infecção pode ser adquirida por via inalatória ou traumática, podendo disseminar-se para diversos órgãos e sistemas.

O diagnóstico laboratorial da esporotricose esta baseado no isolamento e identificação de seu agente etiológico de materiais biológicos. Entretanto, têm sido descritas dificuldades no diagnóstico em algumas formas clínicas, como a forma localizada, linfangítica nodular com lesões atípicas (Keiser & Whittle, 1991; Al-Tawfiq & Wools, 1998) e formas disseminadas com

acometimento do sistema nervoso central (SNC) (Donabedian et al. 1994; Heller & Fuhrer, 1991; Keiser & Whittle 1991; Penn et al. 1992). A meningite por *S. schenckii* é um evento raro, mesmo em pacientes imunossuprimidos, e seu diagnóstico é difícil pela baixa carga parasitária ao exame de líquido. Penn e colaboradores (1992) relataram um paciente com Aids e esporotricose onde somente após cinco meses do aparecimento das lesões cutâneas foi feito o diagnóstico de meningite (com realização de quatro exames líquóricos). Estes achados são contrastantes quando o espécime biológico analisado é secreção ou biópsia cutânea, onde *S. schenckii* é evidenciado com relativa facilidade (Rippon, 1988).

2. ESTADO DE ARTE

2.1. HISTÓRICO

Sporothrix schenckii foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos da América 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). 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). *S. schenckii* 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).

2.2. O PATÓGENO

S. schenckii é o agente etiológico da esporotricose. 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 fortes evidências moleculares sugeriram que este fungo conta com mecanismos de recombinação na natureza (Mesa-Arango et al. 2002). Análises moleculares da região 18S do rDNA mostraram evidências indiretas de que a forma sexuada deste fungo fosse *Ophiostoma stenoceras* (Berbee & Taylor, 1992), porém, estudos morfológicos realizados por Dixon e colaboradores 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); as diferenças também são observados quando ambas as 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 determinadas regiões 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*. Estudos moleculares mais recentes (Meyer et al. 2008) unidos aos de Berbee & Taylor (1992), reforçam, entretanto, que a forma teleomórfica do *S. schenckii* pertença ao gênero *Ophiostoma*.

O habitat natural de *S. schenckii* pode ser vegetação, madeira em decomposição ou não, e solo. Em vida saprofítica ou em cultivo a 25°C o fungo 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). Em parasitismo ou em cultivo a 37°C em meios de cultura especiais, *S. schenckii* se apresenta como levedura unicelular ovalada, globosa e em forma de charuto, podendo apresentar um ou mais brotamentos (Chandler et al, 1980).

Recentemente Marimon e colaboradores (2008), caracterizaram *S. schenckii* como sendo um complexo de pelo menos seis espécies filogeneticamente relacionadas, desconsiderando *S. schenckii* como espécie única. Duas dessas espécies têm sido associadas com infecção humana (*S. brasiliensis* e *S. globosa*).

2.3. PATOGENIA DA ESPOROTRICOSE

2.3.1 Patogenia, formas clínicas e tratamento da esporotricose em humanos.

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 o tecido cutâneo e subcutâneo, limitando-se aquém dos linfonodos regionais. Indivíduos que trabalham com solo ou plantas, tais como 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). Eventualmente, a inalação dos conídios do fungo pode levar a uma infecção primária pulmonar e posterior disseminação, tal como nas micoses sistêmicas (Rippon, 1988).

A esporotricose afeta ambos os sexos em qualquer idade. É uma doença geralmente benigna, de localização cutânea em 95% dos casos, com o surgimento das lesões em três a doze semanas após inoculação do agente. O aspecto clínico da esporotricose é muito variado, observando-se as seguintes formas clínicas: cutânea fixa, linfocutânea, cutânea disseminada e extracutânea (Morris-Jones, 2002). A forma mais comum é a forma linfocutânea, a qual se inicia com o aparecimento de um nódulo subcutâneo pequeno, duro, móvel, não aderido, que evolui para vários nódulos subcutâneos ao longo dos canais linfáticos locais, que podem supurar ulcerar e drenar pus. A forma cutânea fixa 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 a via hematogênica é usada pelo fungo para se disseminar pelo organismo (Morris-Jones, 2002). A forma pulmonar primária (forma extracutânea) é muito rara e ocorre após a inalação de conídios. Clinicamente é parecida com a tuberculose onde a área apical do pulmão parece ser o sítio de infecção mais comum. Há casos descritos de disseminação hematogênica desta micose, atingindo ossos, olhos, articulações, sistema nervoso central e trato genito-urinário (Rippon, 1988). A forma extracutânea não decorre exclusivamente da forma pulmonar primária, mas também pode evoluir de uma lesão cutânea (Kwon-Chung & Bennet, 1992). As formas disseminadas e extracutâneas ocorrem mais frequentemente em indivíduos imunocomprometidos, tais como alcoólatras, diabéticos, pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), leucemia, transplantados de órgão ou medula óssea, indivíduos sob corticoterapia e pacientes infectados pelo HIV (Al-Tawfiq & Wools, 1998).

Recentemente, Gutierrez-Galhardo e colaboradores reportaram o aparecimento de eritema nodoso e eritema multiforme em pacientes com esporotricose. Tal patologia está provavelmente relacionada a mecanismos de hipersensibilidade e, até o momento, entre as infecções fúngicas, esta associação somente foi descrita exclusivamente em histoplasmose e coccidioomicose (Gutierrez-Galhardo et al. 2002 e Gutierrez-Galhardo et al. 2005).

Atualmente o itraconazol (ITC) é a droga de eleição para o tratamento da esporotricose

cutânea (Kauffman et al. 2007), sendo a taxa de cura numa dose de 100 a 200mg em estudos abertos, O ITC é metabolizado no fígado, interagindo com medicamentos que são metabolizados por esta via, apresentando assim diversas interações medicamentosas, podendo inviabilizar o seu uso. O iodeto de potássio é eficaz e de baixo custo, entretanto o seu mecanismo de ação é desconhecido e apresenta uma série de reações adversas. A anfotericina B é bastante efetiva nas formas disseminadas ou extracutâneas da esporotricose, mas possui inúmeros efeitos colaterais. O fluconazol é menos eficaz sendo considerado uma droga de 2ª linha para o tratamento da esporotricose. Estudos *in vitro* e clínicos apontam a terbinafina como uma droga promissora no tratamento da esporotricose, possuindo um excelente perfil de sensibilidade ao *S. schenckii* (Coskun et al. 2004).

2.3.2 Patogenia da esporotricose em gatos.

A patogenia da esporotricose em animais está sendo muito bem caracterizada nos últimos anos (Schubach et al. 2004 e Schubach et al. 2006) onde alguns autores descrevem as lesões como ulceradas, exsudativas, de bordos irregulares que podem tomar grandes proporções e em alguns casos disseminam (Marques et al. 1993). A forma disseminada da esporotricose em animais foi descrita por Garrison e colaboradores em 1979, onde a lesão inicial 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 óbito (Marques et al. 1993).

A estreita relação entre seres humanos e animais de estimação pode ser apontada como um dos fatores responsáveis pela transmissão de doenças infecciosas como é o caso da dermatofitose, verminoses, toxoplasmose, leishmaniose, entre outras, em que o animal constitui um reservatório do agente infeccioso em questão, sendo algumas vezes assintomático. A transmissão de esporotricose de animais infectados (cães, gatos, cavalos, etc.) para seus tratadores, tem sido descrita na literatura (Marques et al. 1993); algumas vezes, não só com diagnóstico clínico, mas também com isolamento do fungo.

Os felinos são muito susceptíveis a *S. schenckii*. Os sítios de infecção mais frequentes são os membros, nariz e orelhas. 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 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, esses animais 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. Schubach e colaboradores descreveram em um estudo retrospectivo de 347 gatos com esporotricose, 28 casos de gatos com esporotricose e o vírus da imunodeficiência felina (Schubach et al. 2004). 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 paciente no momento da arranhadura (Schubach et al. 2001b).

2.4. PROVÁVEIS FATORES DE VIRULÊNCIA

Fator de virulência pode ser definido como algo que o microorganismo expresse que aumente sua patogenicidade no hospedeiro, tais como certas enzimas, proteínas e moléculas complexas como a melanina (Casadevall, 2006). De modo geral a virulência é o resultado do desequilíbrio da interação hospedeiro-microorganismo, onde os danos causados pelo microorganismo e/ou o hospedeiro afetam a homeostase (Casadevall, 2008).

Steenbergen e colaboradores (2004) sugerem que a origem da virulência em *S. schenckii* esteja relacionada às relações inter-microbianas existentes em seu habitat natural, já que, *in vitro* demonstrou-se que células leveduriformes de *S. schenckii* quando fagocitadas por *Acanthamoeba castellanii*, uma ameba de solo, são capazes de sobreviver em seu interior, matar a ameba e utilizá-la como nutriente, capacidade esta não compartilhada por fungos patogênicos que não vivam em tal habitat, como *Candida albicans* ou por fungos não patogênicos, como

Saccharomyces cerevisiae, mas também presente em outros fungos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*.

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 infecções linfangíticas, 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 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).

O fungo *S. schenckii* também apresenta a capacidade de sintetizar melanina. Este composto está altamente relacionado à virulência de diversos fungos (Jacobson, 2000). *S. schenckii* sintetiza melanina em seus conídios 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, também foi demonstrada a produção de melanina por *S. schenckii* nas formas leveduriformes, tanto *in vitro* como durante a infecção. As hifas, porém, não são capazes de sintetizar melanina por esta via, somente os conídios (Morris-Jones et al. 2003), e possivelmente a melanização dos conídios seja um mecanismo de escape por torná-los 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).

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 casos mais graves de esporotricose (Morris-Jones et al. 2003).

A adesão primária às células endoteliais e epiteliais, assim como aos componentes da matriz 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 matriz extracelular: fibronectina, laminina e colágeno do tipo II (Lima et al. 1999; Lima et al. 2001). Os mecanismos de adesão a essas moléculas, no entanto, não estão ainda bem esclarecidos. 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). Também foi 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 se tenha demonstrado as proteínas expressadas pelas células endoteliais responsáveis pela interação, as proteínas fúngicas necessárias para o reconhecimento e adesão não foram identificadas, e seu papel como fator de virulência ainda precisa ser esclarecido.

O papel de diferentes proteínas na virulência de diversos fungos já está bem caracterizado (Vicentini et al. 1994, Latgé, 1999, Woods, 2003). Todavia, o papel de diferentes proteínas de *S. schenckii* na virulência deste fungo permanece obscuro. Acredita-se que fosfatases ácidas atuem na interação fungo-macróforo, 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 atuar como fator de virulência (Carlos et al. 1999).

2.5. RESPOSTA IMUNE NA ESPOROTRICOSE

Os mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e no controle de infecções causadas por *S. schenckii* ainda não são muito bem compreendidos, porém, devem incluir tanto a resposta imune humoral como a celular (Carlos et al. 1992; Maia et al. 2006). A indução e expressão da resposta imune celular dependem de uma complexa interação entre antígenos, macróforos e linfócitos. Além disso, a disseminação da esporotricose está freqüentemente associada com terapia de droga imunossupressora e com doenças que causem o mesmo efeito (Rosa et al. 2005). Na resposta imune celular, alguns aspectos já foram esclarecidos, tais como a ativação de macróforos por células T CD4⁺ no combate ao fungo (Tachibana et al. 1999). Ambas as células T CD4⁺ e os macróforos são requisitadas para o desenvolvimento da formação do granuloma, o qual é o componente essencial na defesa do hospedeiro. Essas células liberam IFN- γ , que tem demonstrado ser a citocina mais potente como ativadora da atividade fungicida de macróforos mais potente. O TNF- α também ativado por IFN- γ , atua sobre macróforos produzindo reativos de nitrogênio, em especial óxido nítrico (NO) que atua de forma citotóxica no controle da multiplicação de *S. schenckii*, e é produzido nos momentos iniciais da infecção,

bem como no seu término (Fernandes et al. 2000; Maia et al. 2006). A indução da produção de reativos de oxigênio por monócitos e macrófagos após a fagocitose de conídios e células leveduriformes de *S. schenckii*, também já foi verificada (Romero-Martinez et al. 2000), além da atividade mitótica de glicoproteínas presentes na forma parasitária do fungo (Carlos et al. 1999). 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). Células dendríticas são potentes células apresentadoras de antígenos induzindo resposta Th1, iniciando um papel importante na resposta imune mediada por células. 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).

S. schenckii também é capaz de ativar o sistema complemento, em especial a via alternada, embora não se possa descartar a ativação da via clássica do complemento durante a infecção, a qual normalmente requer a participação de anticorpos. A via alternada talvez seja ativada por células leveduriformes de *S. schenckii*, o qual possivelmente ajuda na opsonização, fagocitose e produção inflamatória aguda de uma resposta durante o início da infecção. A ativação do sistema complemento favoreceria a fagocitose destas células, 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 fúngicas (Torinuki & Tagami, 1985; Scott et al. 1986).

Quanto à resposta imune humoral na esporotricose, já foram caracterizados determinantes antigênicos de peptido-ramnomananas em coelhos, estes não apresentam reações cruzadas contra manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, todavia são verificadas fracas reações cruzadas contra glicopeptídeos da parede celular de *Ophiostoma stenoceras* (Lopes-Alves et al. 1994). Alguns autores sugerem que anticorpos específicos contra *S. schenckii* têm pouco efeito na resistência do hospedeiro (Tachibana et al. 1999). Entretanto, 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). Estes

anticorpos são desencadeados depois da primeira semana de infecção, aumentando no décimo quarto dia, mantendo seus níveis por todo o período de infecção. Estes altos níveis de anticorpos podem estar envolvidos com uma proteção imune específica.

Recentemente nosso grupo detectou imunoglobulinas IgG, IgM e IgA em soros de pacientes com esporotricose contra exoantígeno de *S. schenckii*, antes e depois do tratamento antifúngico. Mais de 95% dos pacientes estudados apresentaram anticorpos da classe IgA e 85% apresentam anticorpos das classes IgG e IgM antes do tratamento. Dos pacientes tratados, os títulos de IgG aumentaram em 91% dos pacientes (Almeida-Paes et al. 2007b). São necessários estudos sobre quais outras imunoglobulinas estão envolvidos nas respostas aos diferentes antígenos do fungo ao longo do tratamento e qual o comportamento desses anticorpos no decorrer da doença e após a cura clínica.

2.6. EPIDEMIOLOGIA

A esporotricose é a micose subcutânea mais prevalente na América Latina (Diaz, 1989). No Brasil, esta doença foi primeiramente reportada em 1907 (Lutz & Splendore, 1907). Desde então, outros casos têm sido descritos e é possível encontrar esporotricose em quase todos os estados brasileiros, como por exemplo, no Rio Grande do Sul e em São Paulo (Lopes et al. 1999; Rosa et al. 2005).

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. 1992; Hajjeh et al. 1997). Vários surtos têm sido relatados, como o primeiro e mais conhecido surto ocorrido no sul da África numa mina de ouro em 1947 e outro descrito 31 anos depois, no Lago de AYARZA Distrito do Sul na Guatemala, onde 53 casos foram observadas dentro de três anos. Em 45,3% dos casos, a infecção surgiu após o manuseio de peixes (Mayorga et al. 1978) dentre outros casos relatados (Hay & Morris-Jones, 2008). Epidemias envolvendo grande número de pessoas ou amplas regiões geográficas são raras e têm sido relacionadas a uma fonte de infecção comum no ambiente (Coles et al. 1992; Schubach & Schubach, 2000).

A casuística da esporotricose no Estado do Rio de Janeiro tem requerido atenção especial. Estudo realizado por Barros e colaboradores demonstrou que, no período de 1987 a 1998, apenas

treze casos de esporotricose humana foram diagnosticadas no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, onde somente em dois pacientes a fonte de infecção desta micose foi associada à arranhadura por um gato doente. Entretanto, num período de seis anos (1998 a 2004), 759 casos de esporotricose em humanos, 1503 casos em felinos e 64 cães foram diagnosticados no mesmo centro, sendo 85% dos casos caninos e 83,4% dos humanos causados por contato com gatos com esporotricose e 55,8% dos últimos casos reportados foram por mordida ou arranhadura de gatos (Schubach et al. 2008). O maior número de casos ocorre no município do Rio de Janeiro, principalmente nos bairros do Centro, Campo Grande, Bangu e nos municípios de Duque de Caxias e São João de Meriti. Estes dados confirmam a ocorrência de uma endemia de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro.

2.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico definitivo da esporotricose é realizado pelo isolamento e identificação de seu agente etiológico em meios de cultura. As células leveduriformes presentes no material clínico são pequenas, escassas e de difícil observação no exame micológico direto (KOH a 10%). Esfregaços de pus e *in print* de biópsias de lesões corados pelo Giemsa aumentam a sensibilidade do teste, já que a visualização das formas parasitárias é favorecida. Para cortes histológicos costuma-se usar impregnação pela prata, PAS e HE, porém, a menos que o material esteja muito rico em células parasitárias, não é fácil a observação das formas leveduriformes de *S. schenckii* (Morris-Jones, 2002). Geralmente, estas têm aspecto globoso a ovalado com brotamentos claveiformes, no interior de macrófagos, e, em cerca de 40% dos casos de esporotricose, nota-se a presença do corpo asteróide, substância eosinofílica de forma radiada constituída de complexo antígeno-anticorpo, que se deposita na parede de alguns fungos (Morris-Jones, 2002).

O isolamento de *S. schenckii* é facilmente obtido através do cultivo do espécime clínico, que, em geral, é biópsia ou o pus da lesão, em meios de cultura específico, em especial, Sabouraud com cloranfenicol, para evitar contaminação bacteriana, incubados a 25°C ou temperatura ambiente. Conforme observado na figura 1, após o crescimento, em torno de cinco a sete dias, observam-se colônias filamentosas hialinas com aspecto úmido que com o tempo podem apresentar coloração escura (figura 1A) ou permanecerem hialinas. Para a identificação correta do fungo, faz-se um estudo dos aspectos microscópicos da forma filamentosa de *S. schenckii* (Figura 1B) e demonstração de sua capacidade de dimorfismo, fazendo-se a conversão

do fungo à forma leveduriforme, em meio BHI ágar com extrato de levedura a 37°C, incubando por cinco dias. Após esta conversão, o fungo assumirá um aspecto cremoso de cor bege amarelado (Morris-Jones, 2002). Microscopicamente, essa cultura apresenta células leveduriformes hialinas, pequenas, globosas com um mais brotamentos claveiformes (figura 1C). Com todos esses passos necessários o diagnóstico definitivo pode ser concluído em torno de, pelo menos, 15 dias.

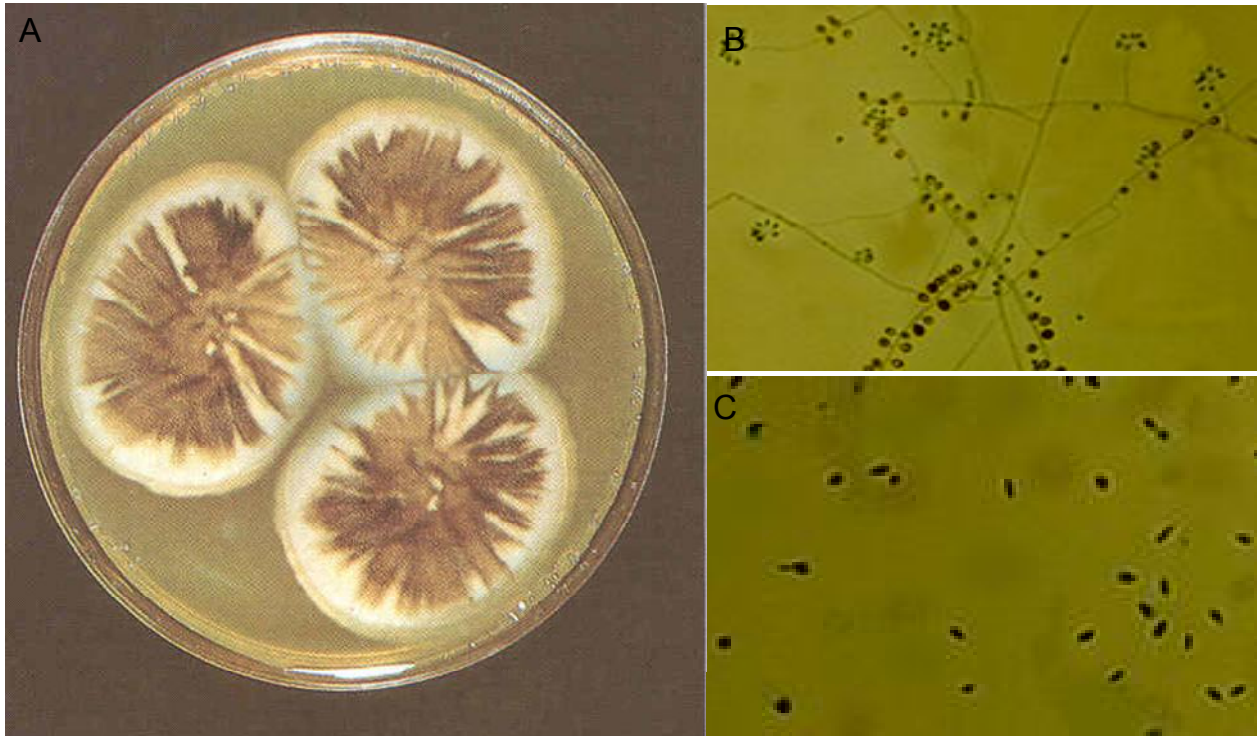


Figura 1: Aspecto macromorfológico de cultura de *S. schenckii* incubada a 25°C por sete dias (A). Aspectos micromorfológicos (B e C) de *S. schenckii* em sua forma filamentosa crescidos a 25°C (B) e sua forma leveduriforme crescidos a 37°C (C). Foto produzida no Laboratório de Micologia - Setor de Diagnóstico Micológico.

Várias técnicas têm sido descritas para o estabelecimento do diagnóstico sorológico da esporotricose. Reações de imunodifusão dupla para esporotricose não costumam apresentar reações cruzadas com soros de pacientes com leishmaniose e cromoblastomicose, doenças com manifestações clínicas semelhantes às da esporotricose e o teste de imunoeletroforese também apresenta grande sensibilidade, sendo observado nos casos positivos à presença de um arco anódico, chamado arco S (Albornoz et al. 1984). Os testes de aglutinação em tubo e em partículas de látex permitem obter resultados acerca da presença ou ausência de antígenos ou anticorpos de forma rápida, demonstrando boa sensibilidade e especificidade, em torno de 90% (Karlín &

Nielsen, 1970; Blumer et al. 1973; Casserone et al. 1983).

Técnicas sorológicas mais sensíveis também começaram a serem padronizadas para sua utilização no sorodiagnóstico da esporotricose. Loureiro y Penha & Lopes-Bezerra (2000) descreveram a detecção de anticorpos contra uma peptido-ramnomanana da parede celular de *S. schenckii* por ELISA em soros de pacientes com esporotricose. Este teste apresentou 100% de sensibilidade, quando testado frente a 35 soros de pacientes com esporotricose confirmada. Soros de pacientes com leishmaniose apresentaram baixa reatividade cruzada com esse antígeno. Entretanto, quando tal técnica foi validada com um número maior de soros, apresentou 90% de sensibilidade e 80% de especificidade (Bernardes-Engemman et al. 2005). A técnica de *western blot* apresenta 100% de sensibilidade para os antígenos de 40 e 70 kDa (Scott & Muchmore, 1989). Recentes trabalhos de nosso grupo, porém, demonstraram a ocorrência de intensas reações cruzadas em *western blot* realizados com esses antígenos, especialmente com soros de pacientes com paracoccidiodomicose, os quais não foram utilizados na determinação inicial da especificidade do *western blot* por Scott & Muchmore (Almeida-Paes et al. 2004 e Almeida-Paes et al. 2007a).

Alguns estudos têm sido realizados sobre a estrutura antigênica de isolados de *S. schenckii*. Um recente estudo mostra que extratos de cultura da forma filamentosa do fungo apresentam 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 fúngicos e também de se estudar os componentes antigênicos de sua forma leveduriforme (Mendoza et al. 2002). Três glicoproteínas da parede celular de 84, 70 e 58 kDa de *S. schenckii*, que se ligam à concanavalina A, apresentam reatividade na técnica de *western blot* com soros homólogos (Lima & Lopes-Bezerra, 1997). O perfil protéico de um antígeno de superfície do *S. schenckii*, foi semelhante em cinco isolados estudados, com macromoléculas variando entre 120 a 15 kDa (Almeida-Paes et al. 2002), sendo algumas delas reativas com soros de pacientes com esporotricose. Entretanto, alta reatividade cruzada foi observada com soros de pacientes portadores de micoses sistêmicas e oportunistas.

3. RELEVÂNCIA

De 1998 até os dias de hoje, os Serviços de Dermatologia Infecçiosa e Zoonoses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) vem observando a maior e mais duradoura epidemia de esporotricose transmitida por felinos na cidade do Rio de Janeiro e municípios adjacentes (Barros et al. 2001; Barros et al. 2004). Entre 1998-2001 178 casos de esporotricose foram diagnosticados, com um predomínio de adultos (70,8%) e de mulheres com idade média de 39 anos. A forma clínica predominante foi a linfocutânea (55,6%) seguida da forma cutânea fixa (25,3%). Entretanto apresentações consideradas raras como lesões cutâneas com múltiplas localizações (16,3%) e envolvimento da mucosa conjuntival e nasal (2,8%) também foram observadas (Barros et al. 2004). Além disso, associações clínicas pela primeira vez descritas, como eritema nodoso (Gutierrez-Galhardo et al. 2002) e eritema multiforme (Gutierrez-Galhardo et al. 2005), foram evidenciadas. A artralgia, manifestação normalmente não associada à esporotricose, esteve presente em 30% e a artrite em 9,4% dos pacientes. Da mesma forma a remissão espontânea, embora descrita raramente, ocorreu em 7% dos casos (Barros et al. 2004).

O diagnóstico da esporotricose é estabelecido com o isolamento em cultivo de seu agente etiológico, *S. schenckii* (Rippon, 1988). Métodos sorológicos tem sido empregados, porém utilizando extratos brutos, sem padronização (Karlín & Nielsen, 1970; Caserone et al. 1983). Mais recentemente, métodos como Imunoblot (Scott & Muchmore, 1989) e ELISA (Loureiro y Penha & Lopes-Bezerra, 2000) têm sido descritos, porém utilizando preparações antigênicas não totalmente caracterizadas. Poucos são os antígenos de *S. schenckii* descritos na literatura. Entre eles, destacam-se os de 84, 70, 58 e 40 kDa da forma leveduriforme (Lima & Lopes-Bezerra, 1997; Scott & Muchmore, 1989) e os de 167, 90, 55 e 40 kDa da forma filamentosa (Mendoza et al. 2002). Entretanto, a natureza biológica destes antígenos ainda não foi determinada, bem como o valor real da sorologia na esporotricose permanece obscuro.

O desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos sensíveis e específicos para serem utilizados na sorologia da esporotricose é fundamental para o diagnóstico desta infecção nos casos onde se torna difícil a obtenção de adequado material clínico para exame, como no caso de infecção osteoarticular e do sistema nervoso central, além de poder contribuir, como ocorre em outras micoses, na avaliação da resposta terapêutica do paciente. Portanto, a avaliação de uma metodologia

específica, utilizando um antígeno desenvolvido por nós, contribuirá possivelmente para uma melhoria nos métodos de diagnóstico já existente, de extrema importância uma vez que os métodos sorológicos até então disponíveis somente nos proporcionam informações presuntivas de esporotricose e parâmetros clínicos e epidemiológicos devem ser levados em consideração. Além disso, um melhor entendimento da resposta imune humoral dos pacientes com esporotricose envolvidos no surto epidêmico descrito anteriormente, antes, durante e após o tratamento específico, poderia fornecer dados mais significativos sobre a eficácia do tratamento.

4. OBJETIVO GERAL

Considerando as dificuldades encontradas no diagnóstico da esporotricose, principalmente em casos onde se torna difícil a obtenção de adequado material clínico para exame, como no caso de infecção osteoarticular e do sistema nervoso central, e por muitas vezes a necessidade da obtenção de um diagnóstico rápido e preciso, este trabalho tem como principal objetivo obter um maior entendimento da resposta imune humoral em pacientes com esporotricose, bem como validar uma reação imunoenzimática (ELISA) no sorodiagnóstico da esporotricose.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a resposta imune humoral de pacientes com esporotricose cutânea através da determinação do perfil de anticorpos produzidos durante a evolução da doença.
2. Avaliar a utilidade e sensibilidade da técnica de ELISA no diagnóstico e acompanhamento terapêutico da esporotricose nas formas linfocutânea e localizada.
3. Explorar as possíveis correlações entre o diagnóstico clínico, micológico e sorológico da esporotricose cutânea em população definida.
4. Avaliar a sensibilidade e especificidade da ELISA em pacientes com esporotricose com infecção pelo HIV.
5. Avaliar a aplicabilidade da ELISA no diagnóstico de pacientes com esporotricose e infectados pelo HIV.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. AMOSTRAGEM

Dois desenhos de estudo distintos foram realizados: um estudo longitudinal para a avaliação clínico-laboratorial da ELISA na esporotricose em soro de pacientes em tratamento antifúngico; e um estudo transversal em população de pacientes com esporotricose infectados pelo HIV.

6.1.1. Avaliação clínico-laboratorial do ELISA em pacientes com esporotricose cutânea

Para determinação do perfil de anticorpos e verificação de classes de imunoglobulinas (IgG e IgM) ao longo do tratamento, foram selecionados na soroteca do Setor Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia – IPEC - Fiocruz, um total de 207 amostras de soros de pacientes com esporotricose, atendidos no Ambulatório de Micologia no período de Janeiro de 2005 a Dezembro de 2007. Os critérios utilizados para seleção dos soros foram:

a) Critérios de inclusão: Foram incluídos no estudo soros de pacientes armazenados na soroteca do Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia- IPEC, que tenham sido tratados com itraconazol numa dose de 100mg por dia e que tenham até três amostras coletadas nos seguintes intervalos:

1- Tempo zero: no momento do diagnóstico (antes do início do tratamento).

2- Tempos três a seis meses após início da doença (corresponde a três a seis meses após o diagnóstico e um mês após a suspensão do tratamento – cura clínica).

3- Tempo de 9 a 12 meses após início da doença (corresponde a 9 a 12 meses após o diagnóstico).

Os grupos foram distribuídos da seguinte maneira:

Grupo A: Pacientes com diagnóstico clínico confirmado por exame micológico positivo, ou seja, isolamento de *S. schenckii* em cultivo de espécime clínico.

Grupo B: Pacientes com indicação clínica e epidemiológica de esporotricose com exame micológico negativo.

b) Critérios de exclusão: Foram excluídas amostras de soros hemolisadas ou lipêmicas conforme descrito no POP LM ID 004 (Pizzini et al. 2008).

A amostragem deste estudo é apresentada na tabela 1. Entre as 207 amostras de soro, 170 são provenientes de 58 pacientes com diagnóstico clínico e exame micológico positivo (grupo A) e 37 são provenientes de 23 pacientes com diagnóstico clínico e epidemiológico de esporotricose e que não tiveram crescimento do fungo em cultivo (grupo B). Dos 58 pacientes do grupo A, cinco não receberam antifúngico, pois apresentaram regressão espontânea da doença. Os pacientes do grupo A, foram então distribuídos de acordo com a apresentação clínica: forma cutânea fixa (n=13; 22%), forma linfocutânea (n=40; 69%) e pacientes com regressão espontânea da doença (n=5; 9%) dos quais dois apresentavam forma fixa e três, forma linfocutânea. No grupo B (n=23) 14 pacientes apresentavam a forma fixa da esporotricose (61%) sendo três com regressão espontânea da doença e nove (39%) apresentam a forma linfocutânea.

Tabela 1: Amostragem incluída no estudo.

Grupo	Forma Clínica	Pacientes (n)	Soros (n)
A	Forma fixa	13	38
	Forma linfocutânea	40	118
	Regressão espontânea (Forma fixa e ou forma linfocutânea)	05	14
	Total	58	170
B	Forma fixa	14	24
	Forma linfocutânea	09	13
	Total	23	37
Total		81	207

6.1.2. Avaliação clínico-laboratorial da ELISA em pacientes com esporotricose infectados pelo HIV

Para avaliar a aplicabilidade diagnóstica e a resposta imune de pacientes com esporotricose e infectados pelo HIV, foram selecionadas 31 amostras de soros de 15 pacientes com a co-infecção HIV e *S. schenckii*, aqui denominados como grupo HIV-Ss. Como controles foram utilizados 10 amostras de pacientes infectados pelo HIV previamente testados e sem esporotricose (grupo HIV). A confirmação de pacientes HIV positivos seguiu o fluxograma da Portaria 059 de 28/01/2003 do Ministério da Saúde, o qual preconiza que duas amostras de soro devem ser coletadas em momentos distintos e serem reagentes em métodos imunoenzimáticos. Outras 10 amostras de pacientes com esporotricose confirmada por isolamento em cultivo, com sorologia para HIV negativa (grupo Ss) e 10 amostras de pacientes saudáveis (grupo hígido).

6.1.3. Amostras de soros controle e heterólogos.

Como controle laboratorial, para determinação do ponto de corte (cut off), foram utilizados para a confecção da curva TG-ROC 16 amostras de soros de indivíduos hígidos e 16 amostras de soro de pacientes com esporotricose confirmada por cultivo. Para validar o teste, foram incluídos 50 soros de indivíduos hígidos. Todas as amostras de soros dos indivíduos hígidos foram de doadores de sangue, previamente testados para HIV, Hepatite B, doença de Chagas e sífilis e apresentando resultados negativos em todos os testes.

Os soros heterólogos selecionados para determinação da especificidade do teste também foram obtidos aleatoriamente da soroteca do Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia - IPEC. Ao todo foram selecionados 60 soros heterólogos de pacientes com isolamento em cultivo micológico ou parasitológico dos respectivos agentes etiológicos de suas infecções e/ou indicação clínica dessas infecções com sorologia positiva pelo método de imunodifusão. Assim, 10 soros foram de pacientes com histoplasmose, 10 soros foram de pacientes com de paracoccidioidomicose, 10 soros de pacientes com aspergilose, 10 soros de pacientes com criptococose, 10 soros de pacientes com coccidioidomicose e 10 soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Todas as amostras de soro acima descritas foram obtidas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, área endêmica de esporotricose (Schubach et al. 2008, Lopes-Bezerra et al. 2006) e a

utilização dessas amostras, foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, conforme a resolução CNS nº347/05

6.2 CEPA

Neste projeto foi utilizado o isolado *S. schenckii* 23508 em todo o decorrer do estudo, mantido na coleção de culturas do Setor de Diagnóstico Micológico - IPEC/FIOCRUZ, previamente identificado baseado em suas características morfológicas e bioquímicas. Este isolado foi previamente comparado com outras cepas de *S. schenckii* e demonstrou ser excelente produtora de antígeno, resposta verificada através de imunoblot frente a soro hiperimune produzido em coelhos (Almeida-Paes et al. 2007).

6.3. OBTENÇÃO DO EXOANTÍGENO

O antígeno solúvel da forma filamentosa utilizado no trabalho foi preparado conforme descrito por Almeida-Paes e colaboradores (2007a). O isolado de *S. schenckii* foi inoculado em meio de Sabouraud líquido, na sua forma filamentosa, incubado a 28°C, em estufa com agitação orbital a 100 rpm por 15 dias. Ao final deste período, foi adicionado timerosal na concentração 1:5.000, como preservativo. O sobrenadante da cultura foi então centrifugado, filtrado em membrana Millipore de 0,45 µm, concentrado 10X por diálise reversa contra polietilenoglicol (peso molecular 15.000-20.000, Sigma) e dialisado contra água destilada a 4°C por três dias, com trocas diárias da água.

6.4. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas totais dos antígenos produzidos foi determinada segundo a técnica descrita por Bradford (1976), modificada para utilização com reagente comercial (BioRad, Laboratories Richmond, CA, USA), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. Após o desenvolvimento da reação, a leitura da absorbância foi realizada utilizando-se espectrofotômetro (BioRad Model 550) com filtro de 595 nm de comprimento de onda.

6.5. ELISA

A padronização da técnica de ELISA indireta utilizando antígeno solúvel da cepa 23508 foi previamente realizada por nosso grupo (Almeida-Paes et al. 2007a). A concentração de proteínas e diluição ótima de antígenos e de soro, respectivamente, foi determinada por titulações pareadas realizadas em base do antígeno empregado e de soro humano com alto título de anticorpos contra *S. schenckii* e soro humano de indivíduo saudável. Foram consideradas como ótimas a concentração e diluição do soro 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.

Foi realizada ELISA indireta em fase sólida com todas as amostras de soro colhidas durante a execução do projeto. Antígeno filtrado de *S. schenckii* na concentração ótima (40ng de proteína por poço) foi diluído em 100µl de tampão carbonato (63mM; pH 9,6) e adicionado à placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 90 minutos a 37°C e “overnight” a 4°C. Posteriormente foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (10mM PBS, 0,1% Tween 20, pH 7,3). Sítios inespecíficos foram bloqueados com Superblock locking Buffer em PBS (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram então novamente lavadas como descrito anteriormente, e as amostras de soros foram adicionadas, em duplicata, a cada poço em uma diluição de 1:4.000 para os ensaios de detecção de IgG e 1:2000 para ensaios de detecção de IgM, em 100 µL de tampão de incubação (10mM PBS, 0,1% Tween 20, 5% leite desnatado, pH 7,3). As placas foram então incubadas novamente por 1 hora a 37°C. Após três lavagens adicionais com o mesmo tampão, as placas foram incubadas com anti-imunoglobulina humana conjugada (anti-IgG e anti-IgM) com peroxidase na diluição de 1:32.000 e 1:4.000 respectivamente, em tampão de incubação por 1h a 37°C. Após três lavagens subsequentes, a reação foi revelada com 100 µL por poço de dihidroclorato de o-fenilenodiamina [OPD; 0.4 mg/ml em 0.04% (w/v) H₂O₂] diluído em tampão citrato de sódio 0,01 mol/L, pH 5,5. A reação foi parada pela adição de 50 µL de HCl 3M. As absorbâncias (DO) foram então medidas em um leitor de ELISA (Bio-Rad modelo 550) a 490 nm. Em cada placa foi adicionada à parte, três amostras de controle positivo, três amostras de controle negativo. Além destes, foram utilizados controles para verificar possíveis ligações inespecíficas do anticorpo secundário com o antígeno sensibilizado à placa, denominado controle do conjugado e um controle em branco.

Estes controles foram realizados em duplicata, onde foi adicionado tampão de incubação puro, sem adição do soro no controle do conjugado e adicionado tampão de incubação puro, em substituição do soro, do conjugado e do antígeno nos controles em branco. Neste apenas o sistema revelador foi adicionado. Todos os experimentos realizados neste trabalho foram repetidos nas mesmas condições em dias diferentes por três vezes.

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

Para determinação do ponto de corte (cutoff point) mais adequado foram feitas curvas TG-ROC. Conforme Greiner (1995), esta metodologia permite estabelecer duas alternativas de valores de cutoff, proporcionando assim interpretar resultados intermediários no teste. Esta curva foi estabelecida a partir da reatividade de 16 amostras de soros negativos e 16 amostras de soros positivos no ELISA contra antígeno de *S. schenckii*. A curva elaborada através da observação dos valores variáveis de densidade ótica [DO_{\min} , DO_{\max}] observados nas duas populações de referência (amostras de controles negativas e positivas).

Em probabilidade estatística, o desvio padrão é a medida mais comum da dispersão estatística. De uma distribuição normal unimodal, simétrica, de afunilamento médio podemos 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 distancia 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.

Os valores de sensibilidade e especificidade obtidos da reação (eixo y) foram plotados contra os diferentes valores de densidade ótica observados no experimento (eixo x), e o ponto de corte é a intersecção entre estas curvas geradas no gráfico. O valor do ponto de corte mais ou menos três vezes o desvio padrão foi calculado e a zona de indeterminação foi estabelecida. Assim, foi considerada positiva a densidade ótica das amostras com leitura acima do valor de mais três vezes o desvio padrão e consideradas negativas as amostras com leitura de densidade ótica abaixo do valor de menos três vezes o desvio padrão. Os valores que ficaram dentro da zona de indeterminação foram repetidos.

6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi construído um banco de dados no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), onde foi inserido variáveis de interesse. O estudo foi de natureza exploratória e analisou dados provenientes de uma amostra de conveniência. Foram calculados a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo do teste nessa população específica, e construídas curvas TG-ROC de sensibilidade e especificidade. O grupo de indivíduos hígidos ou afetados por outras patologias serviu de controle laboratorial, mas não constituiu um grupo-controle no sentido epidemiológico tradicional, não havendo qualquer esforço de proceder ao pareamento dos resultados quanto a variáveis sócio-demográficas ou clínicas.

A análise estatística usou testes não paramétricos. Para as análises das amostras pareadas relacionadas aos diferentes tempos, foi utilizado o Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon. E para análise das amostras independentes foi utilizado o Teste da Soma de Postos de Wilcoxon. Em ambos os testes foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), o que corresponde ao nível de confiança de 95%

O padrão-ouro com o qual o novo teste foi contrastado e comparado foi o cultivo do material clínico e isolamento do fungo.

7. RESULTADOS

7.1. PRODUÇÃO DO EXOANTÍGENO

O exoantígeno da forma filamentosa do isolado 23508 de *S. schenckii* obtido após incubação a 28°C sob agitação em meio Sabouraud líquido apresentou uma concentração de proteínas de 0,22 µg/µl, conforme determinação, utilizando o método de Bradford (1976).

7.2 CURVAS TG-ROC E DETERMINAÇÃO DO CUTOFF

As curvas TG-ROC dos ELISAs para detecção de IgG e IgM foram determinadas. A figura 2 mostra os três experimentos de cada isotipo analisado. Pode ser analisado a plotagem dos valores otimizados dos parâmetros de sensibilidade e especificidade (eixo y) contra os diferentes valores de densidade ótica observados no experimento (eixo x). O ponto de corte (cutoff) se caracteriza pela intersecção entre as curvas geradas no gráfico. As ELISAs foram repetidas três vezes em dias diferentes e foi calculada a média dos três valores das curvas. Essas análises determinaram os seguintes valores de cutoff: valor mínimo de 0,360 e máximo de 0,435 para pesquisa de IgG e valor mínimo de 0,235 e valor máximo de 0,415 para pesquisa de IgM. Os valores que ficaram na zona de indeterminação, foram repetidos e os que permaneceram nesta faixa foram considerados indeterminados.

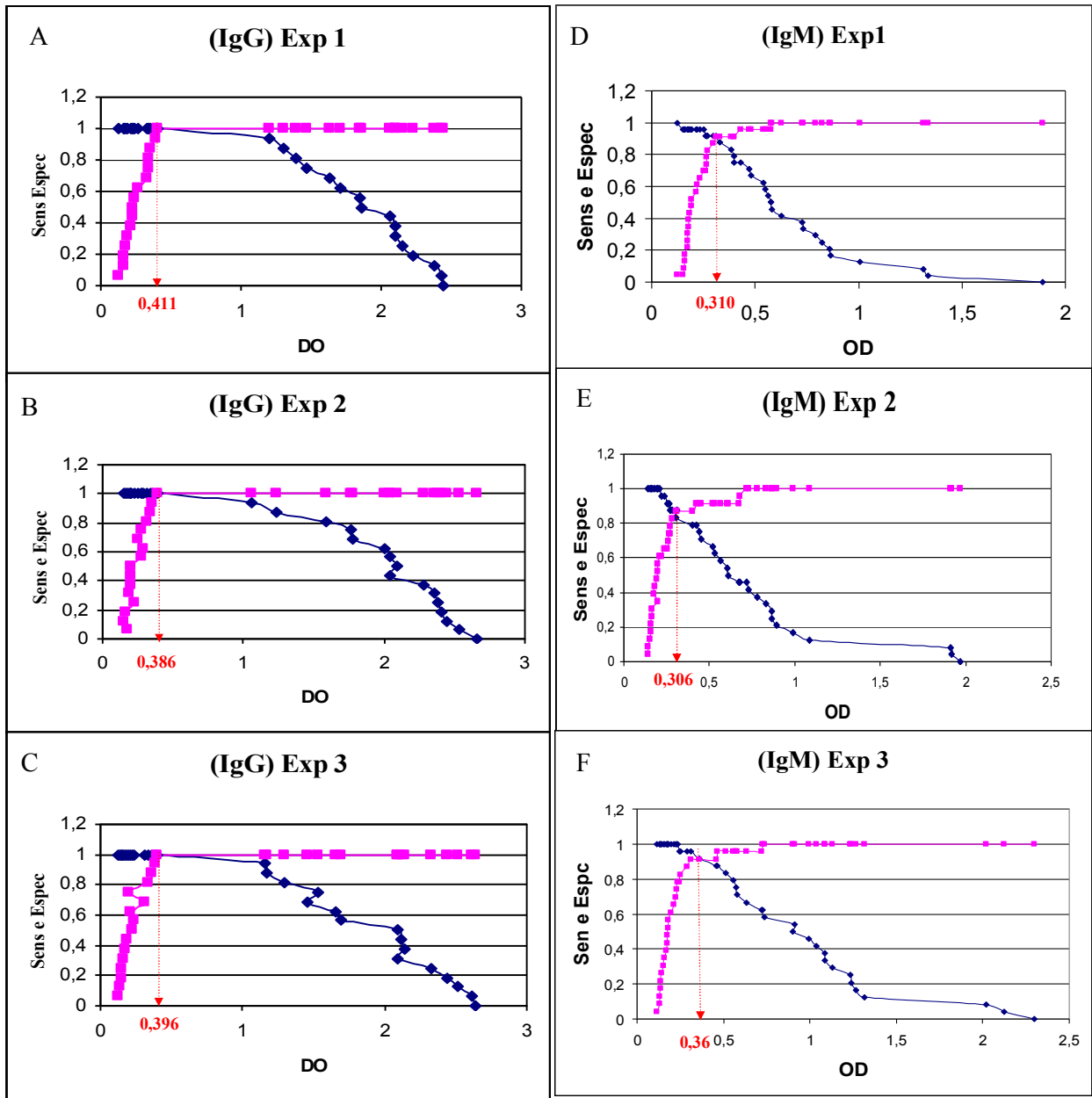


Figura 2: Curvas TG-ROC através da técnica de ELISA na esporotricose, para determinação do "cutoff" dos experimentos para detecção de IgG (A, B e C) e IgM (D, E F).

7.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DOS PACIENTES

Dos 81 pacientes com esporotricose, 58 são do sexo feminino (71,6%) e 23 são do sexo masculino (28,4%). A média de idade dos pacientes é de $45,74 \pm 18,20$ anos. O tempo de evolução da doença nestes pacientes varia de menos de duas a mais de 16 semanas, sendo que 37,5%

apresentam um tempo de evolução de quatro semanas. Em relação à história epidemiológica dos pacientes analisados, na maioria a transmissão foi por arranhadura e ou mordedura de gatos com esporotricose, como pode ser observado na figura 3. A maioria dos pacientes foram tratados (90,1%), porém 9,9% não receberam tratamento antifúngico, pois apresentaram regressão espontânea da doença.

Formas de Transmissão

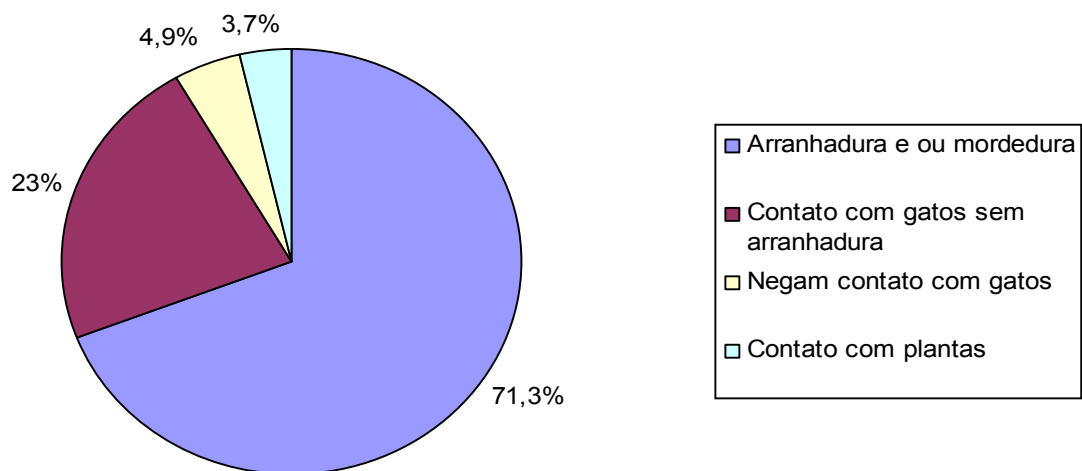


Figura 3: Formas de transmissão dos pacientes analisados no estudo.

A maioria dos pacientes apresentou lesões no membro superior, 60,5% e 17,3% apresentaram lesões nos membros inferiores. Os pacientes que tiveram cultura positiva no diagnóstico da doença utilizando secreção de lesão correspondem a 67,9%. Os pacientes que fizeram tratamento por 12 semanas correspondem a 30,9% e 1,2% abandonaram o tratamento. Os pacientes do grupo A, foram então distribuído de acordo com a apresentação clínica da doença: forma cutânea fixa (n=13; 22%), forma linfocutânea (n=40; 69%) e pacientes com esporotricose e regressão espontânea da doença (n=5; 9%), dois com forma fixa e três com forma linfocutânea (APÊNDICES A e B). O grupo B composto de 23 pacientes, 14 são pacientes que apresentam a forma fixa da esporotricose (61%) sendo três com regressão espontânea da doença e nove (39%) apresentam a forma linfocutânea (APÊNDICE C).

7.4. REATIVIDADE CRUZADA NO ENSAIO.

A partir do ponto de corte definido, foram verificadas possíveis reações cruzadas no ensaio de ELISA. Analisamos a reatividade da técnica em soros de pacientes com diferentes doenças infecciosas que podem ser clinicamente confundidas com esporotricose. Verificou-se que 83% dos soros heterólogos estudados apresentou resultado negativo no teste. Um total de 60 soros heterólogos foram testados e 10 deles apresentaram valores de absorvância acima do ponto de corte, sendo por isso considerado positivos, nos ensaios para detecção de IgG. Dois destes eram provenientes de pacientes com histoplasmose, dois de pacientes com paracoccidiodomicose e, um de aspergilose, um de coccidiodomicose e quatro de leishmaniose. Nenhum dos 10 soros de pacientes com criptococose apresentou resultado positivo. Das 50 amostras de soro de indivíduos hígidos, apenas dois tiveram valores de absorvância acima do ponto de corte. A mediana do grupo de heterólogos foi de 0,288 (IIQ: 0,188-0,379) enquanto que a mediana dos soros dos pacientes hígidos foi de 0,200 (IIQ: 0,152-0,274). O teste de Wilcoxon mostrou que as medianas desses grupos são estatisticamente diferentes ($p=0,002$) (Tabela 3)

A figura 4 mostra a média dos valores de absorvância dos ensaios para detecção de IgG e IgM, dos soros heterólogos, soros de indivíduos hígidos e 20 soros considerados controle positivos de pacientes com esporotricose confirmada.

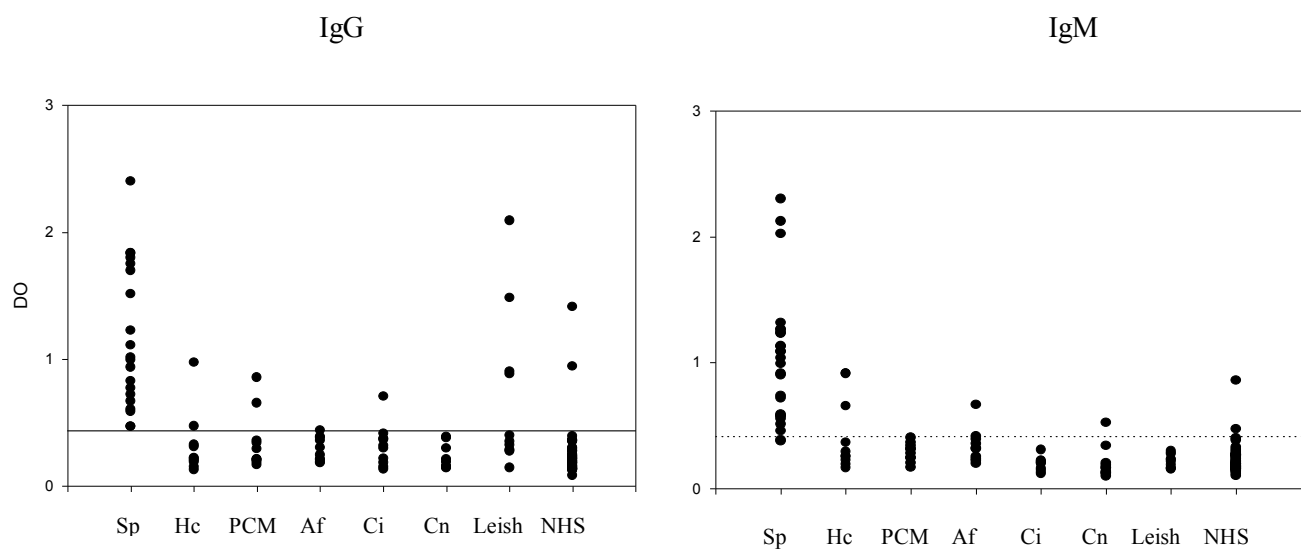


Figura 4: Resposta de anticorpos da classe IgG e IgM contra exoantígenos de forma filamentosa de *S. schenckii* nos soros de pacientes com esporotricose, pacientes com outras doenças infecciosas e de indivíduos saudáveis. A linha horizontal representa o ponto de corte da reação. DO-densidade ótica, Sp-esporotricose, Hc-histoplasmose, PCM-paracoccidiodomicose, Af-aspergilose, Ci-coccidiodomicose, Cn-criptococose, Leish-leishmaniose, NHS-soro de indivíduos hígidos (controle negativo).

Nos ensaios feitos para detecção de IgM utilizando o mesmo grupo, seis amostras de soro de pacientes com outras doenças foram positivas, destes, dois eram de pacientes com histoplasmose, um de paciente com paracoccidiodomicose, dois de pacientes com aspergilose e um com criptococose. No grupo de indivíduos saudáveis apenas dois apresentaram positividade, o que pode ser verificado na figura 3. Na tabela 3 são apresentados os resultados do Teste de Soma de Postos de Wilcoxon, onde a mediana do grupo de heterólogos foi de 0,232 (IIQ: 0,174-0,315) enquanto que a mediana dos soros dos pacientes hígidos foi de 0,199 (IIQ: 0,164-0,265). O teste de Wilcoxon mostrou que as medianas desses grupos são estatisticamente similares ($p=0,075$).

Tabela 3: Mediana e intervalo interquartilico entre os soros heterólogos e negativos, nos testes de detecção de IgG e IgM.

	Mediana (IIQ)		p-valor †
	Heterólogos	Negativos	
IgG	0,288 (0,188-0,380)	0,200 (0,152-0,274)	0,002
IgM	0,232 (0,174-0,315)	0,199 (0,165-0,266)	0,075

† *Teste da Soma de Postos de Wilcoxon*

Foi verificada uma diferença da densidade ótica, entre a média das leituras dos soros dos pacientes heterólogos com os soros dos pacientes com esporotricose, tanto na pesquisa de IgG quanto na pesquisa de IgM. Porém, os valores de densidade ótica nos soros do grupo de pacientes com Leishmaniose ($0,713 \pm 0,635$) quando comparada com a média dos soros do grupo de pacientes com esporotricose ($1,1614 \pm 0,562$) na pesquisa de IgG, se mostram muito próximos. A média das leituras de absorvância obtidos dos soros de pacientes com esporotricose comparada à média da leitura dos soros provenientes de indivíduos saudáveis foi significativamente maior tanto nos ensaios de pesquisa de IgG ($1,1614 \pm 0,562$ e $0,228 \pm 0,062$, respectivamente) quanto nos ensaios de pesquisa de IgM ($1,020 \pm 0,512$ e $0,195 \pm 0,039$, respectivamente), como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4: Resultado da ELISA para detecção de IgG e IgM de soro de pacientes heterólogos e o grupo amostragem, contra exoantígeno de *S. schenckii*.

Grupo de pacientes	IgG		IgM	
	Número de amostras positivas (%)	Media±DP das absorvâncias	Número de amostras positivas (%)	Média±DP das absorvâncias
Esporotricose	205 (98)	1,1614±0,562	188 (89)	1,020±0,512
Histoplasmose	2 (20)	0,318±0,250	2 (20)	0,424±0,292
Paracoccidiodomicose	2 (20)	0,446±0,333	1 (10)	0,289±0,073
Aspergilose	1 (10)	0,289±0,095	2 (20)	0,338±0,136
Coccdiodomicose	1 (10)	0,316±0,168	0 (0)	0,192±0,055
Criptococose	0 (0)	0,220±0,097	1 (10)	0,207±0,130
Leishmaniose	4 (40)	0,713±0,635	0 (0)	0,221±0,053
Indivíduos hígidos	2 (4)	0,228±0,062	2 (20)	0,195±0,039

A tabela 5 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade da técnica de ELISA, frente a soros de pacientes com outras doenças e soros de indivíduos hígidos. O teste apresentou uma especificidade de 89% nos dois ensaios (IgG e IgM) e uma sensibilidade de 98% nos ensaios de detecção de IgG e de 99% nos ensaios de detecção de IgM.

Tabela 5: Parâmetros sorológicos dos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgG e IgM contra os exoantígenos de *S. schenckii* no diagnóstico da esporotricose.

Parâmetro	Valores para detecção de:	
	IgG	IgM
Sensibilidade	98%	99%
Especificidade	89%	89%
Valor preditivo positivo	94%	94%
Valor preditivo negativo	96%	98%

7.5. NÍVEIS DE ANTICORPOS AO LONGO DO TRATAMENTO

7.5.1. Pacientes com diagnóstico clínico de esporotricose cutânea e confirmada por exame micológico – Grupo A.

A concentração de imunoglobulinas específicas (IgG e IgM) foram analisadas nos três tempos e nas diferentes apresentações clínicas. Nos ensaios, 88% dos pacientes foram considerados positivos. Das 170 amostras de todos os pacientes com esporotricose recebendo itraconazol como terapia, apenas seis amostras de soro (3%) foram consideradas negativas e 18 amostras (9%) consideradas indeterminadas. Das amostras negativas, duas correspondem ao soro de um mesmo paciente nos ensaios de detecção de IgG na forma linfocutânea nos tempos 2 e 3 da doença, e quatro amostras são do ensaio de detecção de IgM, o qual uma amostra pertence ao paciente com forma fixa (no tempo 1) da doença e três pertencem a pacientes com forma linfocutânea (uma no tempo 2 e duas no tempo 3) Das 18 amostras que apresentaram valores de absorvância dentro da zona de indeterminação, duas são provenientes de pacientes com forma fixa da doença nos ensaios de IgM, duas de paciente forma clínica linfocutânea nos ensaios de IgG, 12 também forma linfocutânea nos ensaios de IgM e duas amostras do grupo de pacientes com regressão espontânea da doença nos ensaios de IgM.

A figura 5 apresenta o perfil de anticorpos na forma fixa da doença. Para uma melhor visualização do nível de anticorpos dos pacientes ao longo do tratamento, os gráficos foram montados conforme a semelhança dos resultados nas leituras da densidade ótica. Neste grupo é interessante notar que o paciente P12 apresenta níveis semelhantes de IgG nos três tempos, porém nos ensaios de detecção de IgM apresenta um aumento nos níveis de anticorpos no tempo 2 e principalmente tempo 3.

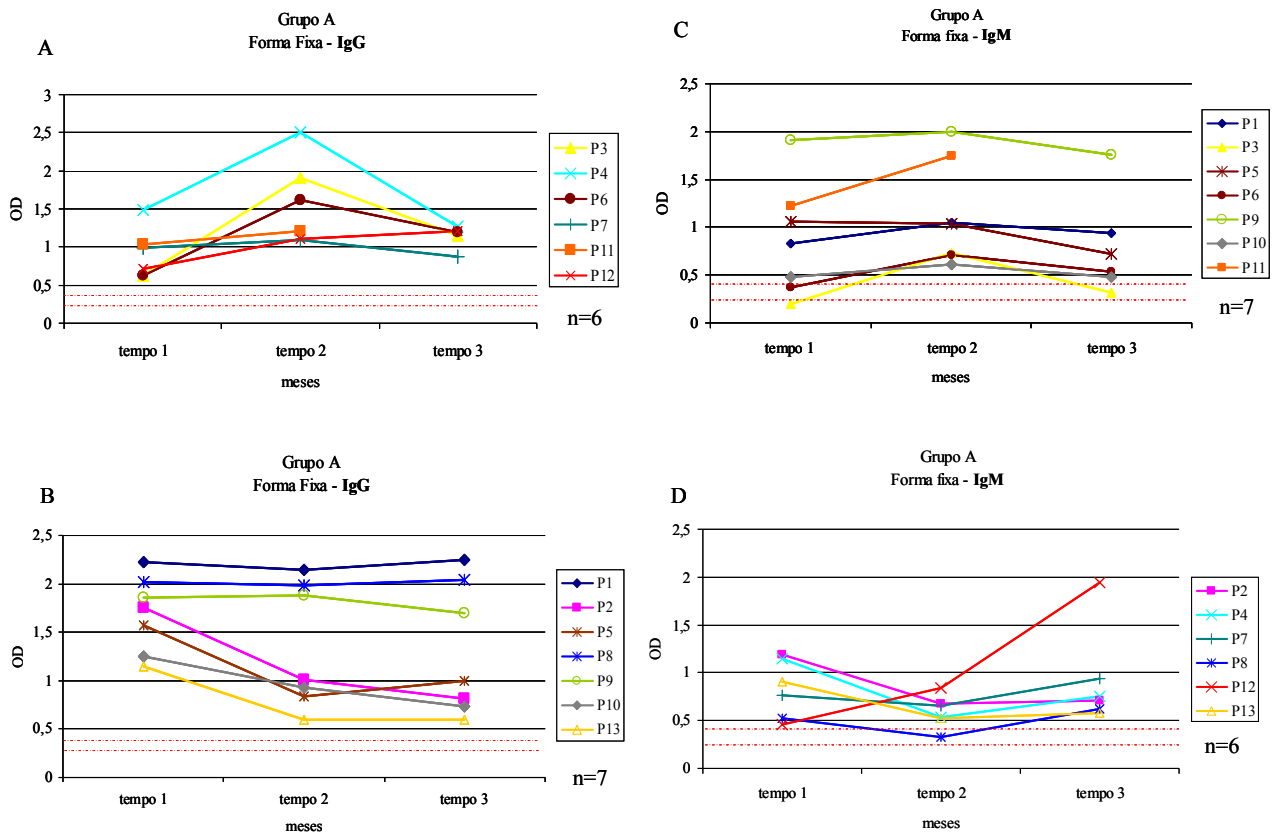


Figura 5: Comparação da reatividade de anticorpos IgG (A e B) e IgM (C e D) dos soros dos pacientes com forma fixa da esporotricose com antígeno de *S. schenckii*, tratadas com itraconazol e acompanhadas até 1 ano. Cada linha representa um paciente. Os símbolos mostram o valor da leitura de densidade ótica antes do tratamento (tempo 1), de 3 a 6 meses após o início do tratamento (tempo 2) e nove a doze meses após o início do tratamento (tempo 3). As linhas tracejadas em vermelho representam os valores de cutoff. Os valores de densidade ótica foram observados a 490nm.

Na forma linfocutânea, a forma mais comum da esporotricose, observa-se que a maioria dos pacientes tem uma queda nos níveis de IgM, e a maioria permanece com os níveis de IgG estáveis ao longo do tratamento (figura 6). Neste grupo de pacientes, apenas o paciente P13 não produziu imunoglobulinas capazes de serem detectadas nos três tempos, tanto nos ensaios de detecção de IgG como de IgM (figura 6B e 6E). Dois pacientes apresentaram títulos indeterminados nos três tempos nos ensaios de detecção de IgM e positivos nos três tempos nos ensaios de detecção de IgG (P14 e P22).

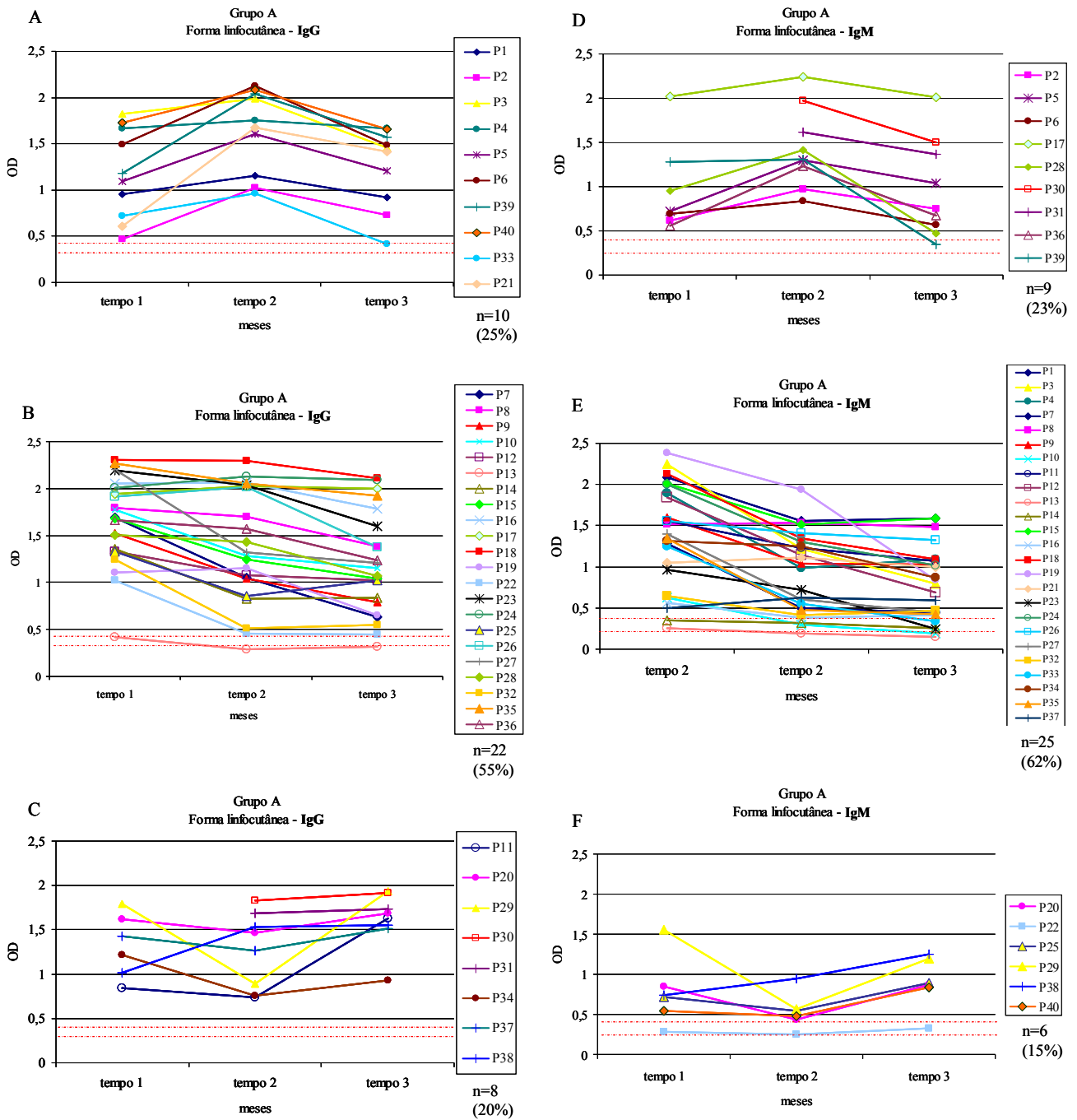


Figura 6: Comparação da reatividade de anticorpos IgG e IgM nos soros dos pacientes com forma linfocitária da esporotricose com antígeno de *S. schenckii*. Pacientes que obtiveram um aumento nos níveis de densidade ótica do tempo 2 e posteriormente uma queda no tempo 3 (A, D). Pacientes que tiveram uma queda nos seus níveis de anticorpos em algum dos três tempos e os que permanecem com leituras óticas semelhantes (B, E). Pacientes com aumento nos níveis de anticorpo no tempo 2 e ou tempo 3 (C, F).

Os grupos de pacientes com regressão espontânea da esporotricose estão representados na figura 7. Observa-se que três pacientes diminuem seus níveis de anticorpos do tipo IgM durante a evolução da doença. O paciente P2 apresenta o tempo 1 e o tempo 2 dentro da zona de indeterminação em IgM e no tempo 3 ele aumenta. Nos testes para detecção de IgG os cinco pacientes apresentaram leituras de densidade óptica mais de duas ou três vezes acima do valor do ponto de corte.

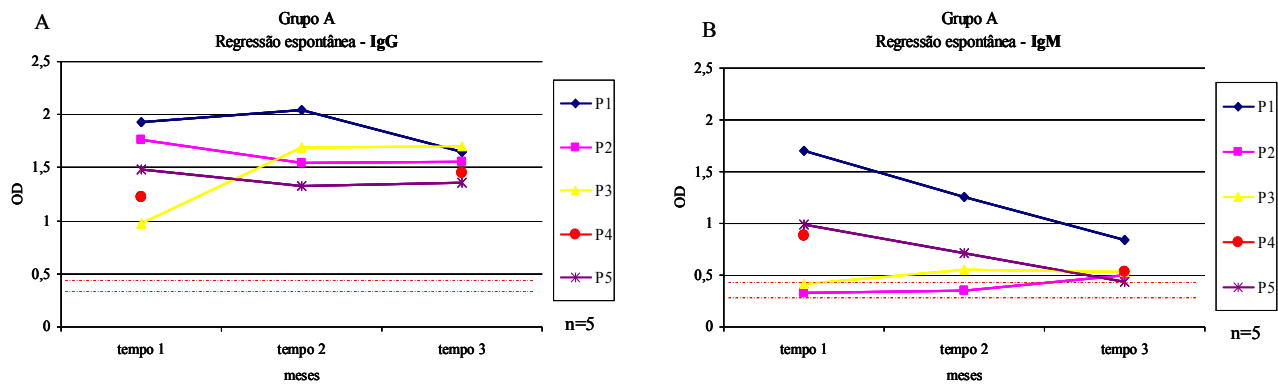


Figura 7: Comparação da reatividade de anticorpos IgG e IgM dos soros dos pacientes com regressão espontânea da esporotricose com antígeno de *S. schenckii*.

A média e o desvio padrão das amostras de soro dos pacientes recebendo terapia antifúngica em cada um dos três tempos de coleta dos soros está representada na tabela 6. Foram verificadas uma diminuição dos níveis de IgM nos pacientes com as diferentes apresentações clínicas, em especial na forma linfocutânea e regressão espontânea da doença, do tempo 1 ao tempo 3 (tabela 6). Não foi observado diferenças nos níveis de IgG nos três tempos de coleta do soro nas diferentes apresentações clínicas.

Tabela 6: Resposta de IgG e IgM contra exoantígenos de *S. schenckii* em pacientes do grupo A, com diferentes apresentações clínicas da esporotricose, nos três tempo de coletas do soro durante terapia antifúngica.

	Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Forma fixa	1,330±0,537	0,849±0,463	1,446±0,590	0,880±0,485	1,235±0,517	0,856±0,498
Forma linf.	1,473±0,496	1,206±0,618	1,437±0,540	0,994±0,520	1,309±0,505	0,871±0,475
Reg.Espon.	1,476±0,386	0,861±0,547	1,651±0,259	0,717±0,337	1,542±0,125	0,569±0,157

Foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparar as medianas dos diferentes tempos de coleta do soro a fim de se observar diferenças estatisticamente significantes entre o tempo 1 e o tempo 2 (T1=T2) o tempo 2 e o tempo 3 (T2=T3), o tempo 1 e o tempo 3 (T1=T3), nas diferentes apresentações clínicas (tabela 7). Observa-se que na forma fixa da doença, tanto nos ensaios de detecção de IgG quanto nos ensaios de detecção de IgM, ao compararmos os diversos tempos entre si (tempo 1, 2 e 3) não apresentam diferenças estatisticamente significantes. O mesmo ocorre no grupo com forma linfocutânea na comparação dos tempos 1 com o tempo 2 com nos ensaios de IgG. Porém quando comparado as medianas do tempo 2 com o tempo 3 ($p=0,004$), e a comparação entre o tempo 1 e o tempo 3 são estatisticamente diferentes ($p=0,342$). Já nos ensaios de detecção de IgM, observa-se diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os três tempos. No grupo de regressão espontânea, algumas comparações não puderam ser feitas devido ao n ser menor que cinco.

Tabela 7: Mediana e intervalo interquartilico dos soros dos pacientes com esporotricose nos três tempos, nos testes de IgG e IgM.

	Mediana (IIQ)			p-valor†		
	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	T1-T2	T2-T3	T1-T3
IgG						
Fixa	1, 250 (0, 850-1, 806)	1, 207 (0, 966-1, 951)	1, 172 (0, 830-1, 591)	0, 600	0, 050	0, 388
Linfo	1, 513 (1, 105-1, 800)	1, 498 (1, 026-2, 009)	1, 398 (0, 925-1, 678)	0, 342	0, 004	0, 006
RegEsp	1,483 (1,103-1,846)	1,615 (1,384-1,955)	1,559 (1,404-1,673)	††	††	0,893
IgM						
Fixa	0,826 (0,468-1,165)	0,713 (0,573-1,041)	0,716 (0,543-0,934)	0,701	0,938	0,754
Linfo	1,263 (0,639-1,658)	1,015 (0,511-1,336)	0,853 (0,453-1,173)	0,002	0,043	0,001
RegEsp	0,887 (0,370-1,341)	0,634 (0,398-1,121)	0,536 (0,467-0,689)	††	††	0,225

†Teste de Postos Sinalizados de Wilcoxon.

†† n<

As figuras 8, 9 e 10 mostram uma análise exploratória dos dados do grupo A, permitindo avaliar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência ou não de valores “outliers” dos mesmos. Valores considerados “outliers” são valores extremos, atípicos, ou seja, são observações que não são bem ajustados dentro do esperado podendo ser chamado também de observações anormais, extremos ou resíduos.

Como foi verificada nas análises estatísticas de Wilcoxon, não foi observado diferença significativa entre as três variáveis tempo de coleta dos soros, dos pacientes com diferentes apresentações clínicas, nos ensaios de pesquisa de IgG (figura 8 A), porém no tempo 2 os valores de densidade ótica se apresentam mais homogêneos quando comparados com os outros tempos. A linha mediana dos valores de densidade ótica do tempo 1, ou seja, antes do início do tratamento, se apresenta muito próxima dos valores de densidade ótica observadas na linha mediana do tempo 2 e 3, após o início e posterior término do tratamento, assim como os valores “outliers”, que também são muito semelhantes. Já nos ensaios de pesquisa de IgM, observa-se uma diminuição dos valores máximos de densidade ótica dos soros em 75% do grupo A nos tempos 2 e 3 após o início do tratamento (figura 8 B).

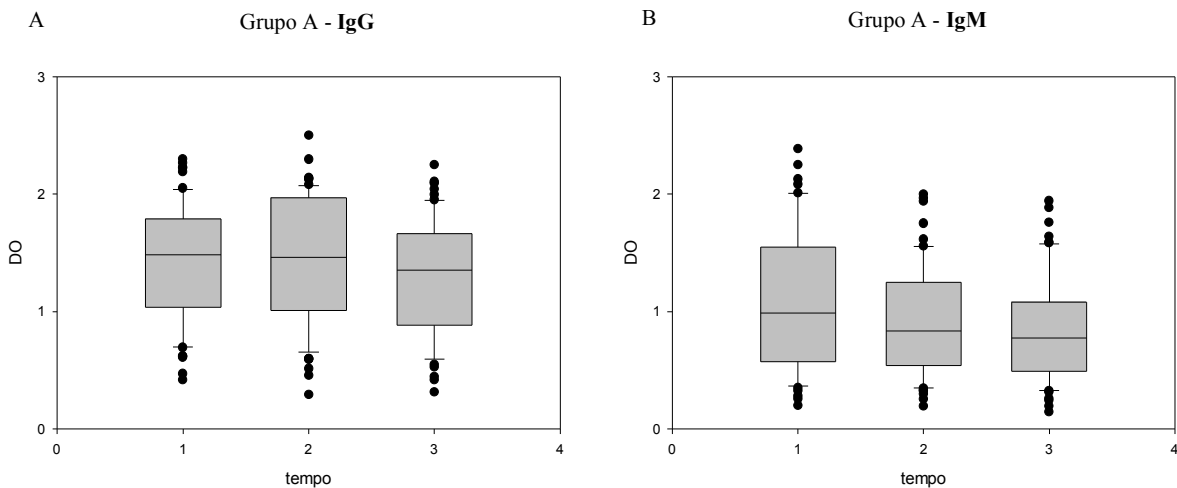


Figura 8: Comparação da reatividade de anticorpos IgG e IgM dos soros dos pacientes do grupo A nos três tempos de coleta dos soros.

Nos ensaios de pesquisa de IgG observa-se que nas diferentes apresentações clínicas ocorre um pequeno aumento da densidade ótica no tempo 2 (figura 9 A, B e C). Os valores “outliers” são observados em maior quantidade no grupo com forma linfocutânea da esporotricose.

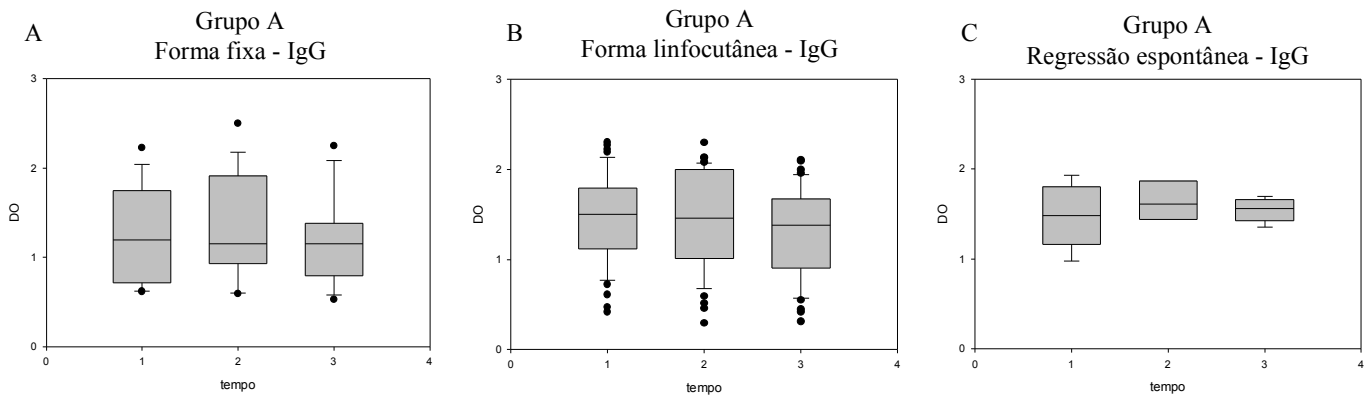


Figura 9: Comparação da reatividade de anticorpos IgG dos soros dos pacientes do grupo A nos três tempo de coleta dos soros e nas diferentes apresentações clínicas.

A figura 10 mostra os ensaios de pesquisa de IgM nos grupos com diferentes manifestações clínicas, onde se observa uma tendência a diminuição dos níveis de densidade ótica nos tempos 2 e 3 no grupo com forma linfocutânea (figura 10 B) e no grupo com regressão espontânea (figura 10 C), bem como é observado que 75% das densidades óticas destes grupos é maior no tempo 1, ou seja, no momento do diagnóstico. Assim como nos ensaios de pesquisa de IgG, valores “outliers” são observados apenas no grupo com forma linfocutânea.

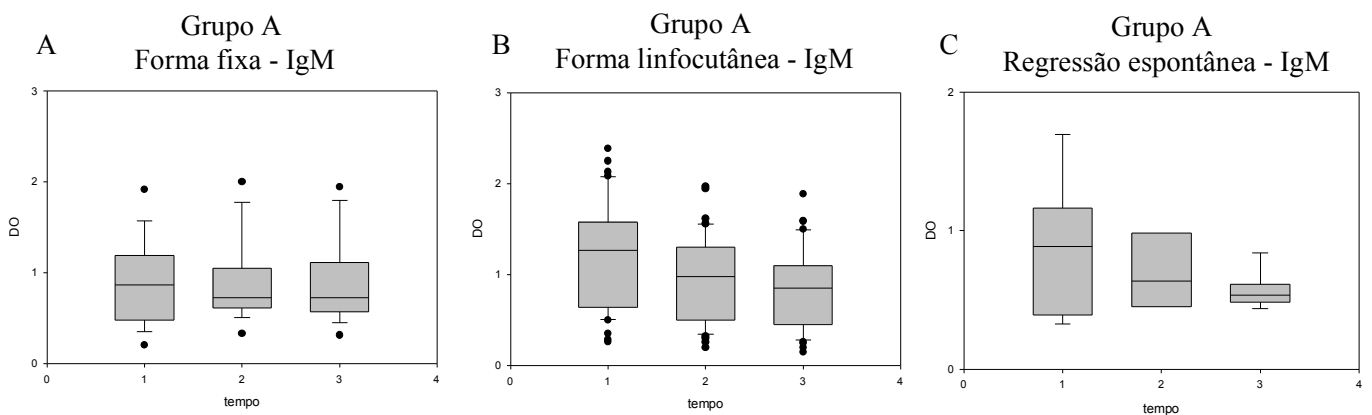


Figura 10: Comparação da reatividade de anticorpos IgM dos soros dos pacientes do grupo A nos três tempo de coleta dos soros e nas diferentes apresentações clínicas.

Para verificar o comportamento da resposta dos pacientes ao longo do tratamento, analisamos a mediana das absorvâncias dos soros de pacientes nos três tempos de coleta com os soros controle negativo (tabela 8). Observa-se uma diferença significativa na comparação da

mediana dos valores de densidade ótica dos soros de indivíduos hígidos com soros dos pacientes nos três tempos de coleta ao longo do tratamento.

Tabela 8: Mediana e intervalo interquartilico em soro de pacientes com esporotricose e o controle negativo e sua comparações estatísticas entres os tempos.

		Mediana (IIQ)			
	NHS	Sp-Tempo 1	Sp-Tempo 2	Sp-Tempo 3	
IgG	0,200 (0,152-0,274)	1,490 (1,050-1,793)	1,535 (1,031-1,990)	1,374 (0,925-1,675)	
IgM	0,199 (0,165-0,266)	0,976 (0,571-1,556)	0,837 (0,540-1,299)	0,751 (0,476-1,081)	

Teste da soma de Postos de Wilcoxon ($p \leq 0,0001$ em todas as análises).

7.5.2. Pacientes com diagnóstico clínico de esporotricose cutânea com exame micológico negativo – Grupo B.

A reatividade de anticorpos da classe IgG e IgM em soros de pacientes com indicação clínica e epidemiológica com cultura negativa pode ser verificada na figura 11. Assim como na detecção de IgG, todos os soros apresentam valores de absorbância para IgM acima do valor do ponto de corte. Para uma melhor visualização, este grupo foi dividido por pacientes que apresentaram os mesmos tempos de coleta dos soros: em quatro pacientes a coleta de soro nos três tempos foi a mesma (figura 11 A e B), e em sete pacientes a mesma se deu nos tempos 1 e 2 (figura 11 C e D). Observa-se que os pacientes tendem manter os níveis de IgG, enquanto os níveis de IgM oscilam dentro dos diferentes períodos de tempo do tratamento, porém a maioria diminui os valores de absorbância. Do total apenas três pacientes apresentam aumento nos níveis de IgM (P1, P3 e P17) quando comparado com os testes de IgG. A média do grupo quando analisados para detecção de IgG é de $1,065 \pm 0,368$ e a média do grupo quando analisados para detecção de IgM foi de $1,689 \pm 0,731$.

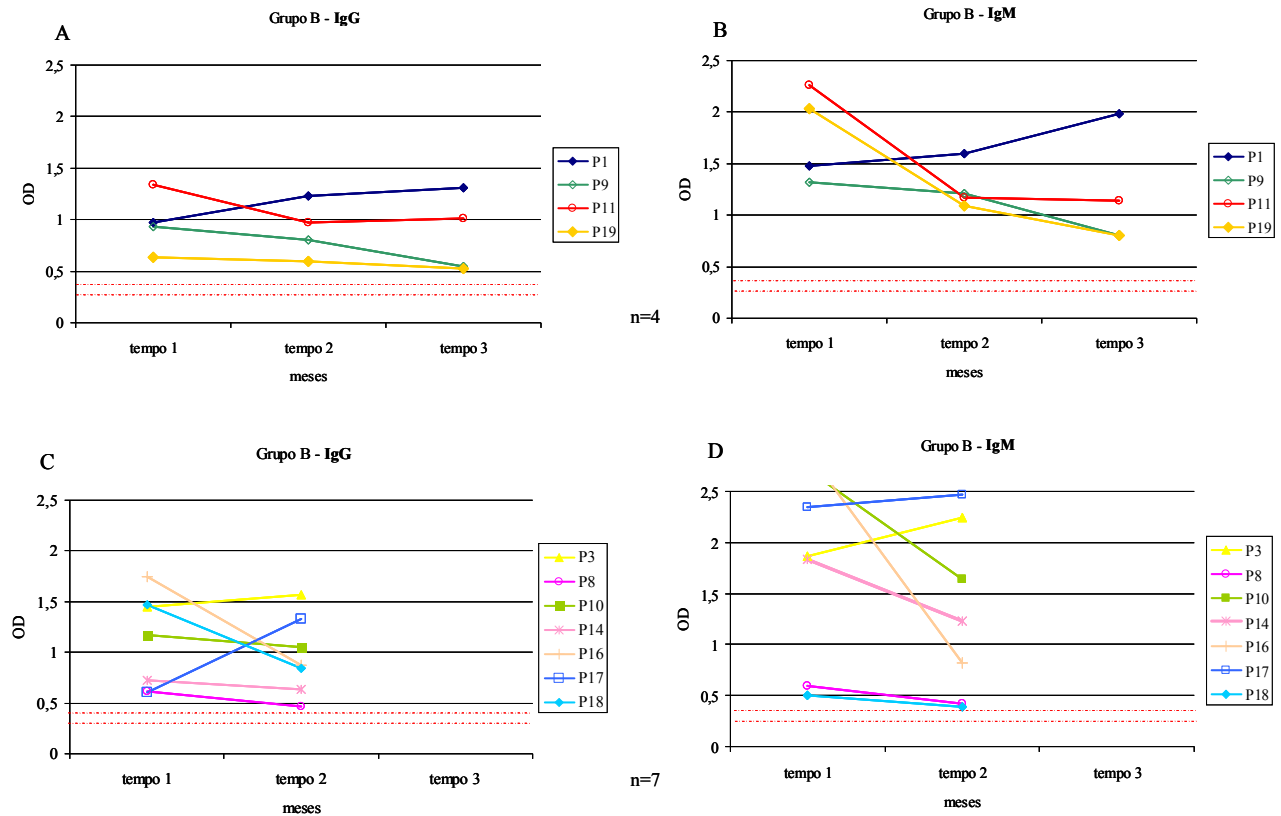


Figura 11: Comparação da reatividade de anticorpos IgG e IgM dos soros dos pacientes sem isolamento em cultivo (grupo B) com antígeno de *S. schenckii*. Os pacientes foram divididos conforme o número de amostras de soros de cada paciente. Pacientes com os três tempos de soro coletados (A e B) e pacientes com dois tempos de soro coletados (C e D).

Embora dos outros 11 pacientes somente obtivemos a primeira coleta de soro antes do início do tratamento, a ELISA foi realizada visando a observação dos níveis de anticorpos. As amostras de todos esses pacientes foram positivas, apresentando valores de densidade óptica duas ou três vezes maiores que o “cutoff”, tanto nos ensaios para detecção de IgG como IgM. A tabela 9 mostra as médias destes pacientes.

Tabela 9: Valores das absorvâncias das amostras de soro pré-tratamento de pacientes com diagnóstico clínico e epidemiológico com diagnóstico micológico negativo, nos ensaios para detecção de IgG e IgM

Pacientes	Médias das absorvâncias na detecção de:	
	IgG	IgM
P2	2,137	2,785
P5	0,922	2,270
P6	1,371	3,021
P7	1,141	2,975
P12	0,806	1,904
P13	1,372	1,044
P15	1,350	2,583
P20	0,91	2,261
P21	0,961	1,604
P22	0,834	1,017
P23	1,406	1,473

7.6. DETECÇÃO DE ANTICORPOS NOS SOROS DE PACIENTES COM ESPOROTRICOSE INFECTADOS PELO HIV.

Para a avaliação da aplicabilidade diagnóstica e resposta imune de pacientes com esporotricose e infectados HIV, foi feita também a reação de ELISA para detecção de imunoglobulinas G e M.

O teste apresentou uma sensibilidade de 90%, especificidade de 85%, valor preditivo positivo de 92% e o valor preditivo negativo de 80%, nos ensaios de detecção de IgG. Já nos ensaios para detecção de IgM apresentou uma sensibilidade de 80%, especificidade de 70% com um valor preditivo positivo de 84%.

A densidade ótica das amostras de cada grupo de pacientes (figura 11) foi analisada, demonstrando que os grupos dos pacientes com esporotricose e infectados pelo HIV (grupo HIV-Ss) e o grupo de pacientes somente com esporotricose (grupo Ss) apresentaram densidade ótica alta, consideradas positivas, quando comparada com os grupos de pacientes sem esporotricose (grupo HIV e grupo Hígido), tanto nos ensaios de detecção de IgG como nos ensaios de detecção

de IgM.

Nos ensaios de detecção de IgG, das 33 amostras de soro dos pacientes portadores de HIV com esporotricose, 29 foram positivas, 1 negativa e 2 apresentaram valores de densidade ótica dentro da zona de intermediação nos 3 ensaios. As amostras que foram negativas neste teste foram colhidas 1 ano após o término do tratamento. A maioria das amostras de soro do grupo de pacientes com esporotricose infectados pelo HIV apresentou positividade quando relacionado com os grupos controle. Todas as amostras de pacientes portadores de HIV sem esporotricose foram negativas.

Nos ensaios de detecção de IgM, 5 amostras do grupo HIV-Ss ficaram dentro da zona de intermediação e 2 foram negativas nos 3 ensaios. Estas sete amostras apresentavam títulos altos, considerados positivos, nos ensaios para detecção de IgG.

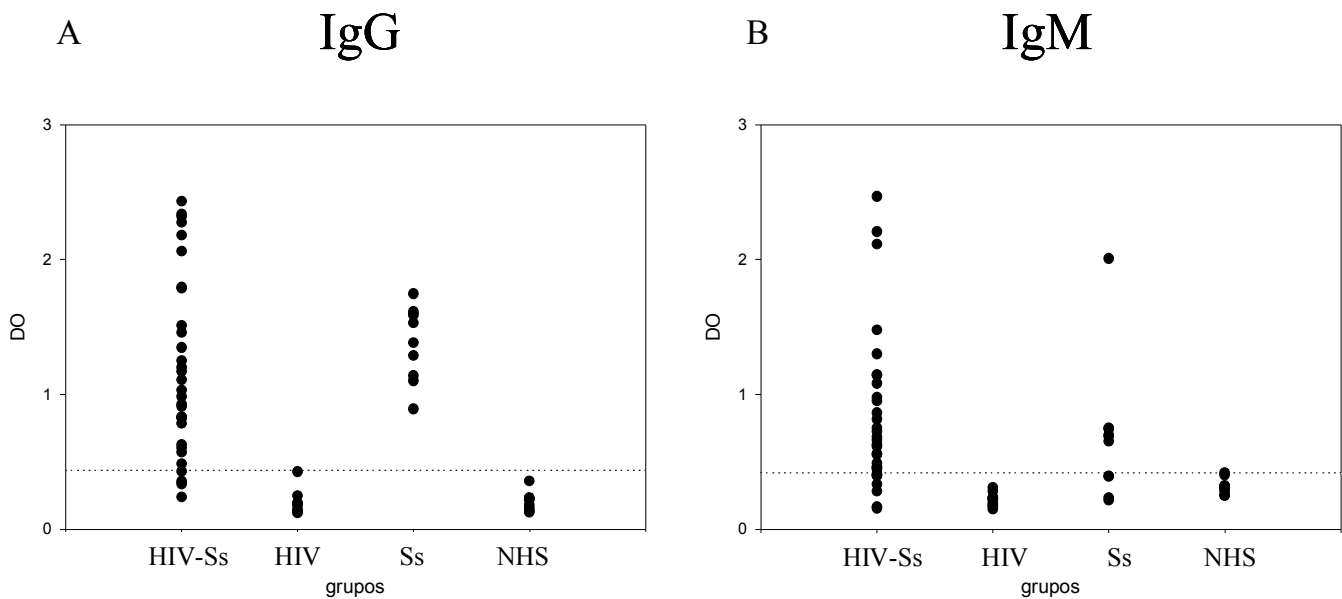


Figura 12: Comparação entre a resposta IgG (A) e IgM (B) nos soros de pacientes dos 4 grupos. Sp= esporotricose, NHS= soro de indivíduos hígidos.

7.6.1. Análise estatística dos dados

A figura 13 e a tabela 10 mostram a comparação das medianas de densidade ótica do grupo de pacientes portadores de HIV com esporotricose 1, 031 (IIQ: 0, 627-1, 788) com a média do grupo dos pacientes com esporotricose não infectados pelo HIV 1, 456 (IIQ: 1, 128-1, 604) onde não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa com $p=0,163$. Reações cruzadas

de antígenos de HIV com *S. schenckii* foram descartadas devido ao fato da mediana do grupo portador de HIV sem esporotricose, que foi de 0,161 (IIQ 0,131-0,207), ser menor que a média no grupo de não portadores de HIV e com esporotricose, que foi de 1,456 (1,128-1,604), nos ensaios de detecção de IgG ($p < 0,001$).

Nas ELISAs para detecção de IgM, observa-se na comparação da mediana da densidade óptica do grupo 1 de 0,503 (IIQ: 0,366-0,810) com a mediana do grupo 3 0,978 (IIQ: 0,773-1,187) uma diferença estatisticamente significativa entre esses grupos com $p = 0,009$. Porém, como ocorre com os experimentos de detecção de IgG, em IgM, reações cruzadas de antígenos de HIV com *S. schenckii* foram descartadas devido ao fato da mediana do grupo que foi de 0,199 (0,168-0,222) ser menor que a média do grupo de soros normais, grupo 4, que foi de 0,309 (0,272-0,342) com $p < 0,001$.

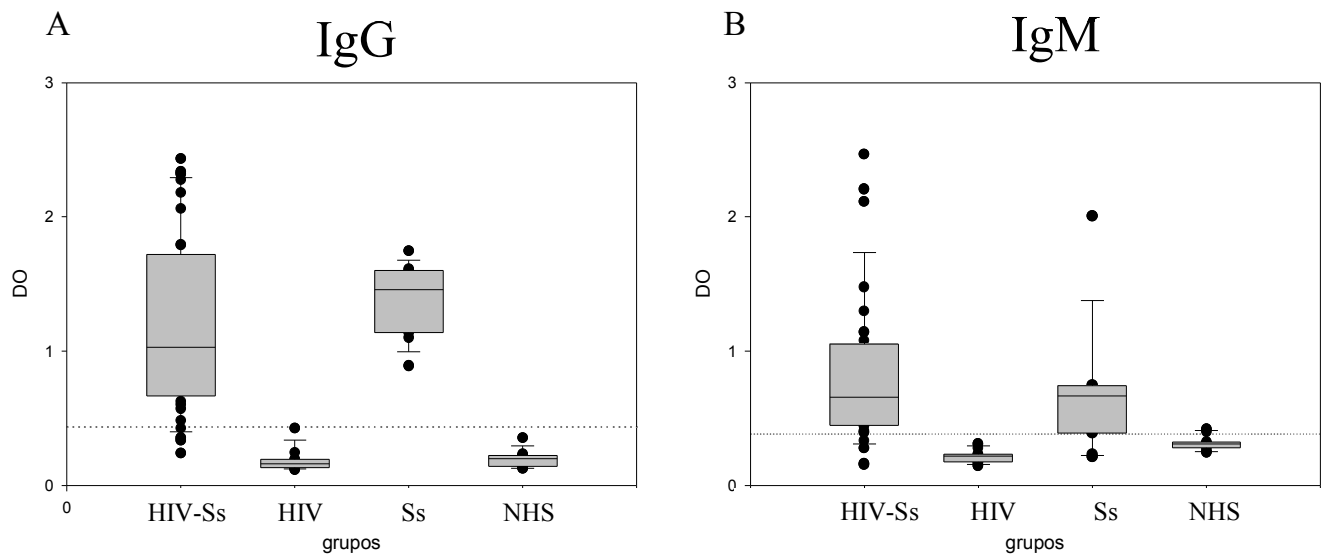


Figura 13: Diferenças estatísticas entre os grupos portadores de HIV com esporotricose (1), grupo de indivíduos com apenas HIV (2), grupo de pacientes com somente esporotricose (3) e o grupo de indivíduos hígidos, no ensaio de ELISA para detecção de imunoglobulinas IgG e IgM.

Tabela 10: Mediana e Intervalo Interquartilico dos indivíduos com HIV e/ou Esporo e soros hígidos nos testes de detecção de IgG e IgM

		Mediana (IIQ)			p-valor†
	grupo HIV-Ss	Grupo HIV	grupo Ss	grupo Hígido	1-3
IgG	1,031 (0,627-1,788)	0,162 (0,131-0,208)	1,456 (1,128-1,604)	0,367 (0,272-0,466)	0,163
IgM	0,503 (0,366-0,810)	0,199 (0,169-0,222)	0,978 (0,774-1,187)	0,309 (0,273-0,343)	0,002

† Teste da Soma de Postos de Wilcoxon. Para as comparações entre os grupos 1-3, 1-4, 2-3 e 2-4, obteve-se $p \geq 0,0001$ em todas as análises.

8. DISCUSSÃO

A esporotricose tem aumentado significativamente no Brasil em especial no estado do Rio de Janeiro, na última década, com ocorrência de uma epidemia relacionada à transmissão zoonótica de gatos em humanos, ocasionando pequenos surtos domésticos e de profissionais (Schubach et al. 2008). Sabe-se que os pacientes envolvidos nesta epidemia habitam áreas com condições sócio-econômicas desfavoráveis e contam com um precário serviço de saúde. Além disso, o aumento do número de casos em nosso estado nos últimos anos está diretamente relacionado à íntima relação de humanos com gatos contaminados (Schubach et al. 2008). Esta forma de transmissão zoonótica da doença tem acarretado em mudanças nas manifestações clínicas 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. 2005). Também é elevado o número de casos de esporotricose cutâneo disseminada, uma forma clínica menos comum da doença (Barros et al. 2003).

A cada ano, vários novos casos estão sendo descritos, sobre o acometimento da esporotricose em pacientes com infecção pelo HIV (Rocha et al. 2001). A maioria desses pacientes apresenta formas disseminadas da doença com acometimento multissistêmico. Por isso outras ferramentas diagnósticas são importantes, principalmente testes sorológicos, como ensaio de ELISA, que são mais rápidos podendo orientar o diagnóstico para a esporotricose.

O padrão ouro no diagnóstico desta doença infecciosa é o isolamento de *S. schenckii* em cultivo micológico. Entretanto é necessário um longo tempo, desde a coleta do material clínico, o crescimento do fungo nos meios de cultura e a realização de todas as análises necessárias para sua correta identificação (Dixon et al. 1992). Além disso, casos de regressão espontânea das lesões e pacientes com esporotricose extracutânea tornam a coleta do material muitas vezes impossível de ser realizada. Como consequência desses fatos, o desenvolvimento de técnicas imunológicas baseadas na detecção de anticorpos e/ou antígenos fúngicos é altamente recomendável e necessária. Várias técnicas sorológicas laboratoriais têm sido aplicadas no diagnóstico desta micose (Scott & Muchmore, 1989; Rosa et al. 2008; Bernardes-Engeman, 2005 e Almeida-Paes et al. 2007a), porém, métodos sensíveis e específicos que possam tornar o diagnóstico desta infecção, nos casos onde se torna difícil a obtenção de adequado material

clínico para exame, como no caso de infecção das articulações e do sistema nervoso central e acompanhamento terapêutico desses pacientes, são de extrema necessidade.

A detecção de anticorpos circulantes em soro de pacientes com esporotricose vem sendo estudadas há anos, onde diferentes métodos imunológicos têm sido desenvolvidos como, precipitação ou aglutinação de complexo 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). Estas técnicas se mostram limitadas devido 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*. Este problema pode ser solucionado pela utilização de testes imunoenzimáticos, visto que eles possuem em geral um limiar de detecção maior e conseqüentemente uma sensibilidade mais elevada, do que os métodos de aglutinação, além de permitirem a diferenciação dos isotipos envolvidos na resposta.

Bernardes-Engemann e colaboradores (2005) descreveram o uso de ELISA no sorodiagnóstico da esporotricose, utilizando uma preparação antigênica purificada da parede celular para detecção de anticorpos da classe IgG, utilizando soro e líquido. A avaliação clínica dos pacientes presentes neste estudo com os dados laboratoriais sugere que a técnica de ELISA apresenta boa resposta ao acompanhamento terapêutico, porém não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de anticorpos detectados antes do início do tratamento com itraconazol, e após o término no tratamento.

Recentemente nosso grupo desenvolveu um teste de ELISA utilizando exoantígenos para detecção de anticorpos IgG, o qual apresentou níveis de sensibilidade (97%) e especificidade (89%) extremamente satisfatórios (Almeida-Paes et al. 2007a). O método de ELISA apresentado por nós, utilizando os mesmos exoantígenos, repete os resultados satisfatórios de sensibilidade de 98% nos testes para detecção de IgG e aumenta a sensibilidade da técnica nos ensaios de detecção de IgM para 99%. Com estes achados acreditamos que a detecção de imunoglobulinas de diferentes isotipos aumenta a confiabilidade da ELISA para o diagnóstico presuntivo da esporotricose.

Posteriormente, estudos utilizando a detecção de diferentes imunoglobulinas em pacientes antes e durante o tratamento para esporotricose também foram realizados por nosso grupo, o qual sugeriu a utilização de detecção de pelo menos dois tipos de imunoglobulina no acompanhamento

da terapia antifúngica desses pacientes (Almeida-Paes et al. 2007b). Entretanto não foi realizado um acompanhamento sorológico individual dos pacientes ao longo do tratamento, sendo apenas analisado grupos de pacientes com e sem terapia antifúngica. Com isso, nosso grupo percebeu a importância na melhoria do diagnóstico imunológico da esporotricose e a necessidade de estudos mais aprofundados da resposta imune humoral e epidemiologia desta micose, cruzando os dados clínicos e as análises laboratoriais de cada paciente, fazendo um estudo contínuo da resposta imune ao longo do tratamento.

A disponibilidade do ELISA, junto com a caracterização parcial de antígenos fúngicos de *S. schenckii*, nos levou a realizar pela primeira vez um estudo longitudinal de 81 pacientes com um ano de acompanhamento, durante a terapia antifúngica. Foi verificada neste estudo assim como em outros trabalhos reatividade cruzada com antígenos de *S. schenckii* com outras doenças (Bernardes-Engemann et al. 2005). Esta reatividade cruzada pode ser devido ao alto grau de glicosilação das proteínas do fungo, visto 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).

Como na maioria dos fungos patogênicos, o desencadeamento da resposta humoral, bem como a associação do aparecimento de anticorpos com o início da infecção e seu papel na defesa do hospedeiro e participação no critério de cura ainda necessitam estudos. Na paracoccidiodomicose, por exemplo, a sorologia positiva pode persistir por mais de um ano após o final do tratamento antifúngico (Valle et al. 2001). Já na esporotricose o tempo necessário para tornar a sorologia negativa é incerto. Na esporotricose não há informações claras sobre a participação da imunidade humoral durante a evolução da doença. Após o monitoramento de 81 pacientes, durante um ano de terapia com itraconazol após o diagnóstico da esporotricose e detecção de níveis decrescentes de anticorpos à medida que a terapia se estende podemos sugerir que nossa metodologia pode ser utilizada no acompanhamento terapêutico desta doença fúngica.

Os parâmetros imunológicos aqui apresentados como os níveis de imunoglobulinas G e M e sua evolução durante a terapia antifúngica, parecem correlacionar com o diagnóstico de esporotricose e sua evolução para a cura. Entretanto alguns pacientes apresentaram IgM alto, durante o regime terapêutico, o que pode ser explicado devido a muitos fungos apresentarem glicoproteínas que poderiam estimular a produção de IgM. Não podemos também descartar a possibilidade de re-infecção nestes pacientes, devido à ocorrência do constante contato com seus

animais domésticos, entre eles os gatos, transmissores zoonóticos em potencial.

Estudos da resposta imune celular da esporotricose em modelos animais (Maia et al, 2006 e Carlos et al, 1999) sugerem um desencadeamento e um aumento da resposta Th1 no início da infecção (1 a 2 semanas) e no final (9 a 10 semanas), apresentando um aumento na produção de IFN- γ que ativam macrófagos e promovem uma imunidade mediada por células. Por outro lado, foi observado que no período intermediário (4 a 7 semanas) este tipo de resposta diminui, e a produção de IL-4 se mostra aumentada, demonstrando a participação da resposta Th2 na esporotricose. Estes resultados sugeriram a participação da resposta imune humoral neste período. Resultados similares foram observados neste estudo. Alguns grupos de pacientes apresentaram diferenças nos perfis e níveis de anticorpos ao longo do tratamento. Nos pacientes incluídos no grupo com diagnóstico micológico positivo com forma linfocutânea nos ensaios de detecção de IgG, 25% apresentaram um aumento da resposta imune humoral no período de 3 a 6 meses do diagnóstico (tempo 2) e 23% dos pacientes apresentam este mesmo perfil nos ensaios de detecção de IgM. Essa diferença nos resultados dos perfis desses pacientes pode estar relacionada com algum tipo de mudança na regulação da resposta Th1 e Th2.

Não foi verificado um perfil único dos níveis de anticorpos ao longo do tratamento dos pacientes independente da forma clínica ou de qualquer outra variável analisada neste estudo. Possivelmente cada paciente responde de forma diferente a infecção pelo *S. schenckii*. Achados semelhantes foram encontrados, em estudo semelhante de acompanhamento sorológico de pacientes com cromoblastomicose tratados com terbinafina ao longo de um ano (Esterre et al. 2000).

Alguns pacientes do nosso estudo merecem atenção especial em seu comportamento sorológico ao longo do tratamento. O paciente P12 (figura 5 A e D) forma fixa apresenta um aumento nos níveis de anticorpos IgM no tempo 2 e principalmente tempo 3. Este paciente apresentou lesões no tempo 1, foi tratado com antifúngico por 2 meses sendo curado no tempo 2, porém apresentou recidiva das lesões no tempo 3. Trata-se de um paciente de 50 anos com seis semanas de evolução da doença, tratada por oito semanas com antifúngico com cura em dois meses e neste caso podemos verificar que o aumento de anticorpos IgM correlaciona com a recidiva da doença.

No grupo de pacientes com a forma linfocutânea da doença, o paciente P13 (figura 6 B e E) não produziu imunoglobulinas capazes de serem detectadas nos testes realizados por nós. Este

é um paciente de 80 anos, com evolução da doença de oito semanas e fez tratamento com antifúngico por 16 semanas. A diminuição dos anticorpos provavelmente foi influenciada pela idade do paciente, uma vez que é sabidamente reconhecida a imunodepressão em idosos (Janeway et al. 2000). O paciente P14 (figura 6 B e E) apresentou resultados indeterminados nos ensaios de detecção de IgM e resultados positivos nos ensaios de detecção de IgG. Este paciente apresentou lesão superciliar esquerda no momento da coleta do soro do tempo 1, fez uso de antifúngico, e no tempo 2 apresentou cicatrização total das lesões. O tempo de evolução da doença deste paciente foi de três meses, fato este que pode estar relacionado com o perfil de anticorpos analisados deste paciente. O paciente P22 (figura 6 B e F) apresentou o mesmo perfil do paciente P14, porém ele manteve as lesões até o tempo 3 e a cicatrização total ocorreu dois meses após o tempo 3, portanto a presença de IgG era esperada. Não foi possível encontrar uma justificativa para explicar o comportamento sorológico de IgM na zona indeterminada.

Alguns pacientes apresentaram o mesmo perfil de imunoglobulinas, com densidades óticas abaixo das linhas do “cutoff” no tempo 2 e tempo 3 nos ensaios de detecção de IgM e certa estabilidade nos ensaios de detecção de IgG (P10, P16, P23 e P33, figura 6), outros não chegaram a negativar, porém houve uma tendência dos valores de densidade ótica em IgM caírem (P4, P7, P12, P18, P19, P24 P27, P32, P34 e P35, figura 6), permanecendo com a semelhança dos valores de densidade ótica nos ensaios para detecção de IgG. O que era de se esperar devido ao fato de que com o tratamento antifúngico a carga parasitária diminuiu e conseqüentemente estimulação antigênica. Como pode ser observada na comparação das medianas dos valores de densidade ótica do grupo de indivíduos hígidos com os valores de densidade ótica dos pacientes nos três tempos, a grande maioria dos soros dos pacientes não chegou a se tornar negativa, o que sugere uma avaliação sorológica com um tempo maior de acompanhamento dos pacientes. Estas observações sugerem que talvez, como em outras micoses (Do Valle et al. 2001), o ELISA não possa ser usada como critério de cura na esporotricose.

Os pacientes P25, P38 e P40 (figura 6) apresentam um aumento nos níveis de imunoglobulinas M enquanto uma certa estabilidade nos níveis de imunoglobulinas G ocorreu. Não podemos aferir grandes conclusões devido à necessidade de um tempo maior de avaliação, porém dizer que reinfecções subclínicas repetidas devido ao contato íntimo com gatos pode levar ao aumento de anticorpos IgM.

Um paciente (P29, figura 6 C e F) apresentou o mesmo comportamento nos ensaios IgG e

IgM com diminuição dos níveis de anticorpos no tempo 2 e aumento no tempo 3 . A evolução da doença ocorreu em 30 dias. No tempo 2 e tempo 3 apresentou lesões, e a cicatrização completa das lesões ocorreu uma semana após o tempo 3. Possivelmente um estímulo antigênico possa estar ocorrendo; entretanto, a evidenciação do mesmo não foi realizada para que justificasse o aumento de anticorpos no tempo 3.

Nos pacientes com regressão espontânea, de modo geral o comportamento sorológico foi o esperado, com os níveis de anticorpos IgM diminuindo ao longo do tratamento.

Com os resultados obtidos no grupo B, é possível afirmar que a técnica de ELISA é uma ferramenta diagnóstica para pacientes que não apresentavam isolamento do *S. schenckii* em cultivo, uma vez que comparando a mediana deste grupo com a mediana do grupo de indivíduos hígidos, observaram-se diferenças estatisticamente significantes. Os quatro pacientes com soros coletados nos três tempos de coletas têm período de evolução da doença de quatro semanas e foram considerados curados entre 2 e 4 meses de tratamento. O paciente P18 do grupo B (figura 11 C e D) apresentou um período de evolução da doença de mais de 16 semanas. Apesar da terceira coleta do soro deste paciente não ter sido incluída nas análises, provavelmente pelo abandonado do tratamento, observou-se que, seus níveis de anticorpos IgM foi bem menor quando comparado com os níveis de IgG, o que já era esperado, devido ao seu tempo longo de evolução da doença. Os pacientes P16 e P17 apresentaram tempo de evolução da doença de 12 semanas e o P10 de oito semanas.

A técnica de ELISA no diagnóstico de pacientes com esporotricose e infectados pelo HIV apresentou valores de sensibilidade de 90% e 80% nos ensaios de detecção de IgG e IgM respectivamente, e os valores de especificidade foram de 85% e 70% nos ensaios de detecção de IgG e IgM respectivamente. Sua aplicabilidade foi confirmada uma vez que a comparação da mediana do grupo de pacientes com esporotricose e HIV e a mediana dos pacientes com apenas HIV, foi estatisticamente diferente. Além disso, a reação cruzada entre antígenos de *S. schenckii* e antígenos virais foi descartada, desde quando comparada as diferenças das medianas do grupo de pacientes infectados apenas com HIV e o grupo de indivíduos hígidos se apresentaram estatisticamente significantes.

O presente trabalho então apresenta resultados inéditos do perfil de anticorpos do mesmo paciente em diferentes tempos de coleta, confirmando alguns achados anteriores já publicados (Almeida-Paes et al. 2007b). A partir dos resultados obtidos, sim, estabelecer-se-ão parâmetros

essenciais ao desenho de futuros estudos com casuísticas maiores (muito possivelmente multicêntricos) e, em certa medida, generalizáveis a outras populações de pacientes com esporotricose.

9. CONCLUSÃO

1. Os pacientes com esporotricose cutânea apresentam imunoglobulinas G e M durante a evolução da doença, bem como após sua cura clínica.
2. O método de ELISA apresentado por nós repete os resultados satisfatórios de sensibilidade de 98% nos testes para detecção de IgG e pode ser aplicada ao diagnóstico presuntivo da esporotricose.
3. A sensibilidade da técnica é aumentada nos ensaios de detecção de IgM para 99%.
4. A detecção dos níveis decrescentes de anticorpos à medida que a terapia se estende sugere que a técnica de ELISA possa ser utilizada no acompanhamento terapêutico da esporotricose.
5. Um maior tempo de acompanhamento de pacientes é necessário para melhor se estabelecer a importância da detecção de anticorpos como critério de cura da esporotricose.
6. A técnica de ELISA é uma excelente ferramenta diagnóstica para pacientes de esporotricose sem confirmação micológica.
7. A sensibilidade 90% e especificidade de 85% da técnica de ELISA nos ensaios de detecção de IgG sugere que esta técnica deveria ser utilizada como ferramenta auxiliar ao diagnóstico de esporotricose associada a AIDS.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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

Almeida-Paes R, Monteiro PCF, Pizzini CV, Peralta JM, Zancopé-Oliveira RM. 2004. Elaboration of an immunoblot assay for the serodiagnosis of sporotrichosis. In: IV Congresso Brasileiro de Micologia, Ouro Preto.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PC, 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* 2007a; 14(3):244-9.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Monteiro PC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. *Clin Vaccine Immunol* 2007b 14(9):1149-57.

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

Barros MB, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Lazéra MS, Cuzzi-Maia 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 MB, 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 MB, Costa DL, Schubach TM, do Valle AC, Lorenzi NP, Teixeira JL, Schubach AO. Endemic of zoonotic sporotrichosis: profile of cases in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008a; 27(3):246-50.

Barros MB, Schubach AO, Schubach TMB, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect* 2008b; 136:1192-1196.

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.

Bernardes-Engemann AR, Orofino RC, Miguens BP, Penha CVL, Neves E, Pereira BAS, Dias CMP, Mattos M, Gutierrez MC, Lazéra M, Schubach A, 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.

Bonifaz A, Saúl A, Paredes-Solis V, Fierro L, Rosales A, Palacios C, Araiza J. Sporotrichosis in childhood: clinical and therapeutic experience in 25 patients. *Pediatr Dermatol* 2007; 24(4):369-72.

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.

Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. *A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases*. Wolfe Medical Publications Ltd p. 112-115. 1980.

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 MC. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 1999;144: 9-14.

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.

Casadevall A. Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe.* 2006; 1:359-364.

Casadevall A. Evolution of intracellular pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62:19-33.

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

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.

Cooper CR, Dixon DM, Salkin IF. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 169-171.

Coskun B, Saral Y, Akpolat N, Ataseven A, Çiçek D. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. *Mycopathologia.* 2004; 158(1):53-6.

De Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, de Hoog GS, Vismer HF, Wingfield MJ. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia.* 2008; 100(4): 647-61

Diaz, IAC. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia* 1989; 103:113-116.

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.

Donabedian H, O'Donnell E, Olszewski C, MacArthur RD, Budd N. Disseminated cutaneous and meningeal sporotrichosis in an AIDS patient. Diagn Microbiol Infect Dis 1994; 18: 111-115.

Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2001; 39(4):373-7

Espinosa-Texis A, Hernández- Hernández F, Lavalle P, Barba-Rubio J, Martínez-López R. Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. Gac Méd Méx 2001; 137:111-116.

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.

Figueiredo CC, Deccache PM, Lopes-Bezerra LM, Morandi V. TGF-beta1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. Microbiology. 2007 Sep; 153(Pt 9):2910-21.

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.

Greiner M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *J Immunol Methods* 1995; 185: 145-146.

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

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 Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol* 2005; 19: 507-509. 2005

Hajjeh R, McDonnell 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.

Hay RJ, Morris-Jones R. Outbreaks of sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008 Apr; 21(2):119-21.

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

Heller HM, Fuhrer J. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. *AIDS* 1991; 5: 1243-1246.

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

Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 2000 Oct; 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 1990. Mother-and-child cases of sporotrichosis infection. *Mycoses* 2000; 33: 33-36.

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

Keiser P, Whittle D. Sporotrichosis in human immunodeficiency virus-infected patient: report of a case. *Rev Infect Dis* 1991;13: 1027-1028.

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

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.

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

Lopes J, Alves S, Mari C, Brum L, Westphalen J, Altermann M, Prates F. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32: 541-545.

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. Rev Med 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.

Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol. 2007 Oct;45(10):3198-206. Epub 2007 Aug 8.

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; 35:327-330.

Mayorga R, Cáceres A, Toriello C, Gutiérrez G, Alvarez O, Ramirez ME, Mariat F. [An endemic area of sporotrichosis in Guatemala]. Sabouraudia 1978; 16(3):185-98.

Mendoza M, Diaz AM, Hung MB, Zambrano EA, Díaz E, 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, 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.

Morris-Jones R. Sporotrichosis. Clin Exp Dermatology 2002; 27: 427-431.

Nascimento RC, Almeida SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Feb 1;43(2):241-7.

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.

Penn CC, Goldstein E, Bartholomew WR. *Sporothrix schenckii* meningitis in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1992; 15: 741-743.

- Pizzini CV, Pimenta MA, Zancopé-Oliveira RM. ELISA esporotricose. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional. Procedimento Operacional Padrão. 2008.
- Rosa AC, 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(3 Pt 1):451-9
- Reed KD, Moore FM, Geiger GE. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 384-387.
- Rippon JW 1988. Sporotrichosis. *In: Medical Mycology*, WB Saunders Company, Philadelphia, p.325-352.
- Rocha MM, Dassin T, Lira R, Lima EL, Severo LC, Londero AT. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol*. 2001 Sep;18(3):133-6.
- 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.
- Schenck BR. Refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the the Sporotricha. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1898; 9: 286-290.
- Schubach TMP, Schubach AO. Esporotricose em gatos e cães – revisão. *Clinica Veterinária* 2000; 29: 21-24.
- 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, TMB, Barros MB, Wanke B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(12):1952-4.
- Schubach AO, Barros MBL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21(2):129-33. Review.

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 A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med.Mycol* 2001b; 39:147-149.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-201). *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 224:1623-1629

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brasil: 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.

Smith PW, Loomis GW, Luckasen JL, Osterholm RK. Disseminated cutaneous sporotrichosis: three illustrative cases. *Arch Dermatol.* 1981; 117:143-144.

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.

St-Germain G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. In: A clinical laboratory handbook. California: Star Publishing Company, 1996.

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.

Torinuki W, Tagami H. 1985. Complement activation by *Sporothrix schenckii*. Arch Dermatol Res. 277:332-333.

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.

Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. 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 Immunol 1994; 62: 1465-1469.

Woods JP. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. Curr Opin Microbiol 2003; 6: 327-33

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

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

11. APÊNDICES

Apêndice A – Análise clínica dos grupos de pacientes no decorrer do trabalho. Pacientes com diagnóstico clínico e com crescimento do *S. schenckii* em cultivo. Todos os pacientes receberam tratamento antifúngico com itraconazol 100mg por dia.

Pacientes	Tempo de evolução da doença em semanas	Tempo de tratamento em semanas
Grupo A com forma fixa		
P1	>16 semanas	>16 semanas
P2	>16 semanas	>16 semanas
P3	4 semanas	16 semanas
P4	4 semanas	12 semanas
P5	3 semanas	>16 semanas
P6	6 semanas	12 semanas
P7	2 semanas	12 semanas
P8	2 semanas	12 semanas
P9	8 semanas	9 semanas
P10	4 semanas	12 semanas
P19	4 semanas	6 semanas
P13	6 semanas	8 semanas
P14	8 semanas	12 semanas
P11	<2 semanas	10 semanas
Grupo A com forma linfocutânea		
P1	3 semanas	12 semanas
P2	<2 semanas	8 semanas
P3	3 semanas	>16 semanas
P4	8 semanas	12 semanas
P5	6 semanas	12 semanas
P6	4 semanas	12 semanas

P7	8 semanas	12 semanas
P8	>16 semanas	12 semanas
P9	8 semanas	12 semanas
P10	4 semanas	12 semanas
P11	4 semanas	16 semanas
P12	8 semanas	12 semanas
P13	8 semanas	16 semanas
P14	16 semanas	>16 semanas
P15	4 semanas	8 semanas
P16	4 semanas	8 semanas
P17	8 semanas	>16 semanas
P18	4 semanas	12 semanas
P19	8 semanas	16 semanas
P20	4 semanas	4 semanas
P21	8 semanas	16 semanas
P22	<2 semanas	16 semanas
P23	8 semanas	8 semanas
P24	4 semanas	12 semanas
P25	2 semanas	10 semanas
P26	4 semanas	9 semanas
P27	4 semanas	8 semanas
P28	2 semanas	8 semanas
P29	Não soube informar	12 semanas
P30	4 semanas	Em andamento
P31	4 semanas	12 semanas
P35	12 semanas	12 semanas
P38	16 semanas	9 semanas
P32	4 semanas	12 semanas
P36	4 semanas	Em andamento
P34	6 semanas	9 semanas
P39	4 semanas	16 semanas
P33	8 semanas	14 semanas
P40	3 semanas	12 semanas
P37	12 semanas	>16 semanas

Apêndice B – Análise do grupo de pacientes com diagnóstico clínico e com crescimento do *S. schenckii* em cultivo nas diferentes formas clínicas que tiveram regressão espontânea da doença. Todos os pacientes receberam tratamento antifúngico com itraconazol 100mg por dia.

Pacientes com regressão espontânea da doença	Tempo de evolução da doença	Forma Clínica
P1	4 semanas	Forma Fixa
P2	3 semanas	Forma linfocutânea
P3	3 semanas	Forma linfocutânea
P4	4 semanas	Forma linfocutânea
P5	4 semanas	Forma fixa e linfocutânea

Apêndice C – Análise clínica dos pacientes nas diferentes formas clínicas, com diagnóstico clínico e sem crescimento do *S. schenckii* em cultivo. Todos os pacientes receberam tratamento antifúngico com itraconazol 100mg por dia.

Grupo B	Tempo de evolução da doença	Forma clínica	Tempo de tratamento
P1	4 semanas	Forma fixa	12 semanas
P2	12 semanas	Forma linfocutânea	6 semanas
P3	16 semanas	Forma fixa	Em andamento
P4	16 semanas	Forma linfocutânea	Não realizado-cura espontânea
P5	<2 semanas	Forma fixa	10 semanas
P6	16 semanas	Forma fixa	12 semanas
P7	4 semanas	Forma linfocutânea	3 semanas
P8	4 semanas	Forma fixa	16 semanas
P9	4 semanas	Forma linfocutânea	Não realizado-cura espontânea
P10	16 semanas	Forma linfocutânea	>16 semanas
P11	4 semanas	Forma linfocutânea	>16 semanas
P12	12 semanas	Forma fixa	12 semanas
P13	.	Forma linfocutânea	>16 semanas
P14	4 semanas	Forma fixa	8 semanas
P15	6 semanas	Forma linfocutânea	Em andamento
P16	12 semanas	Forma fixa	8 semanas
P17	12 semanas	Forma fixa	Em andamento
P18	16 semanas	Forma fixa	8 semanas
P19	4 semanas	Forma fixa	6 semanas
P20	2 semanas	Forma fixa	abandono
P21	4 semanas	Forma fixa	8 semanas
P22	4 semanas	Forma linfocutânea	16 semanas
P23	<2 semanas	Forma fixa	Em andamento