

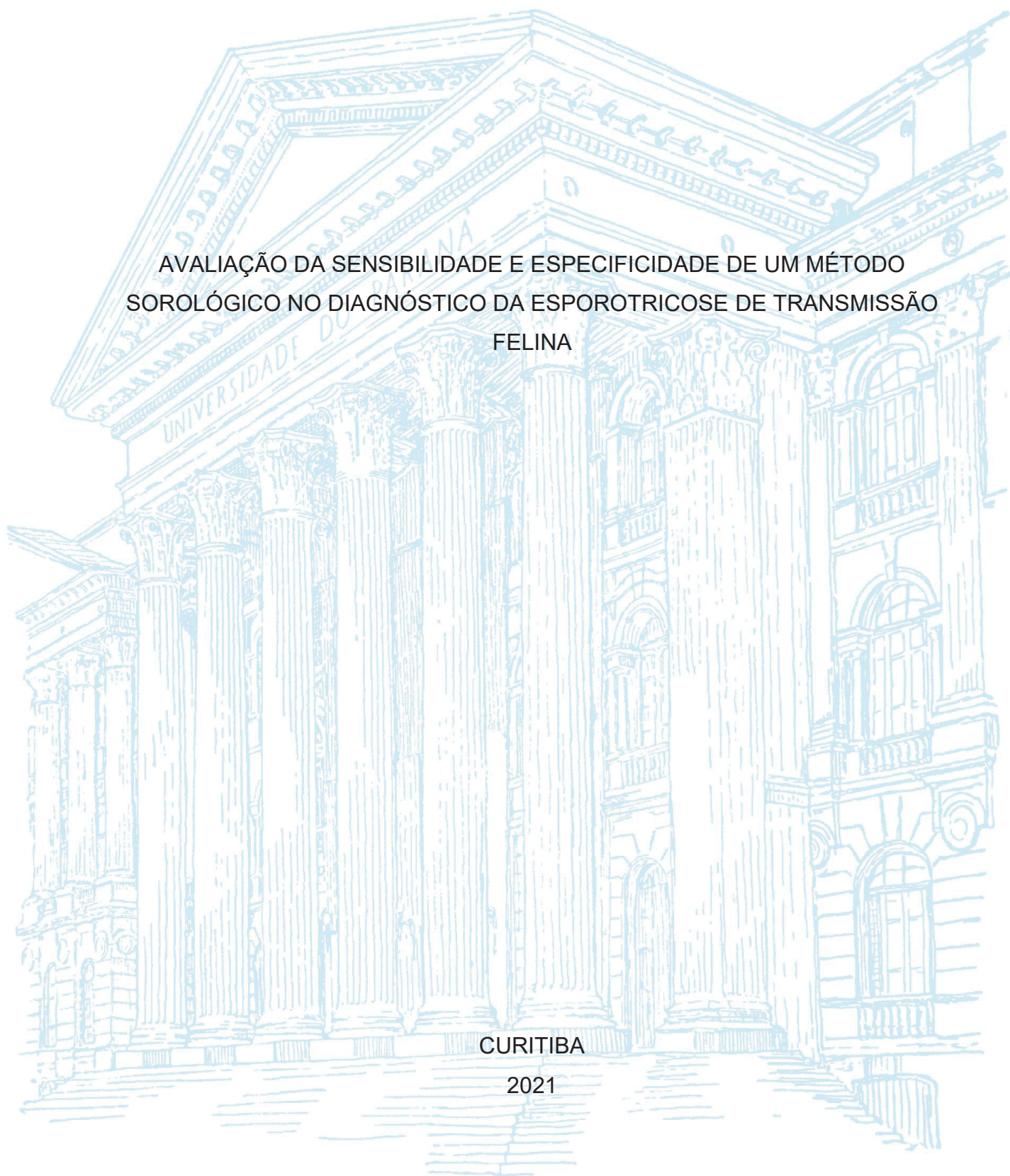
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALISSON CUCH DE MATTOS

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM MÉTODO
SOROLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE DE TRANSMISSÃO
FELINA

CURITIBA

2021



ALISSON CUCH DE MATTOS

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM MÉTODO
SOROLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE DE TRANSMISSÃO
FELINA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles Filho

Coorientadora: Msc. Regielly Caroline Raimundo Cognialli

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mattos, Alisson Cuch de

Avaliação da sensibilidade e especificidade de um método sorológico no diagnóstico da esporotricose de transmissão felina / Alisson Cuch de Mattos. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia..

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles Filho.

Coorientadora: Msc. Regielly Caroline Raimundo Cognialli.

1. Esporotricose. 2. Sporothrix. 3. Imunodiagnóstico. 4. Sorologia. I. Telles Filho, Flávio de Queiroz, 1952-. II. Cognialli, Regielly Caroline Raimundo. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA

No dia vinte de agosto de dois mil e vinte e um às 14:00 horas, na sala Google Meet, Defesa Remota, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **ALISSON CUCH DE MATTOS**, intitulada: **Avaliação da sensibilidade e especificidade de um método sorológico no diagnóstico da esporotricose de transmissão felina**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MARISOL DOMINGUEZ MURO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - HOSPITAL DE CLÍNICAS), IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA UFPR). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 20 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

16/11/2022 14:33:21.0

FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/02/2023 12:45:17.0

MARISOL DOMINGUEZ MURO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - HOSPITAL DE CLÍNICAS)

Assinatura Eletrônica

16/11/2022 13:32:20.0

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ALISSON CUCH DE MATTOS** intitulada: **Avaliação da sensibilidade e especificidade de um método sorológico no diagnóstico da esporotricose de transmissão felina**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

16/11/2022 14:33:21.0

FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/02/2023 12:45:17.0

MARISOL DOMINGUEZ MURO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - HOSPITAL DE CLÍNICAS)

Assinatura Eletrônica

16/11/2022 13:32:20.0

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA UFPR)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 236495

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 236495

Dedico este trabalho de pesquisa à Deus, por ser essencial em minha vida; aos meus avós (*In Memoriam*) que diariamente servem de inspiração; aos meus pais Valdir e Cristina, pois sem eles este trabalho assim como muitos dos meus sonhos não se realizariam e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

RESUMO

Introdução: A esporotricose é a mais prevalente entre as micoses de implantação. É causada por diversas espécies de fungos termo dimórficos, pertencentes ao gênero *Sporothrix*. Atualmente, no Brasil, a maioria dos casos de esporotricose são por *Sporothrix brasiliensis*, transmitido por gatos (*Felix catus*) infectados. O diagnóstico padrão da esporotricose é por isolamento em cultivo, uma vez que os exames micológicos direto e histopatológico, possuem sensibilidade inferior a 30%. Embora existam testes imunológicos validados para a esporotricose, atualmente nenhum deles encontra-se comercialmente disponível no Brasil. O presente trabalho tem como objetivo, avaliar a especificidade e sensibilidade do teste de aglutinação de partículas de látex (LA), comercializado fora do Brasil, em amostras de soro de pacientes com esporotricose de transmissão felina. **Métodos:** Foram utilizadas 154 amostras de soro, classificadas em três grupos: Pacientes com esporotricose (n=45), pacientes com outras micoses (n=57) e indivíduos saudáveis (n=52). As amostras aliqüotadas e mantidas a -20°C, foram avaliadas utilizando-se kits comerciais do teste LA-*Sporothrix* do laboratório Norte Americano IMMY, conforme as instruções do fabricante. As leituras dos testes foram realizadas em duplicata, consistindo em interpretação visual da intensidade da reação das amostras. Para análise estatística, empregou-se o software Excel®. **Resultados:** Foram observados 18,34% de reações falso positivas em títulos de até 1:8, (19 indivíduos do grupo controle e 4 do grupo de outras micoses). O teste apresentou sensibilidade de 33,3%, especificidade de 93,6% e acurácia de 76% quando consideradas apenas reações com titulação $\geq 1:8$. **Conclusão:** Embora com baixa sensibilidade, o teste LA-*Sporothrix* pode ser utilizado correlacionado ao diagnóstico clínico-epidemiológico. Sugere-se ainda considerar como reagentes somente amostras com titulações iguais ou superiores à 1:8.

Palavras-chave: Esporotricose. *Sporothrix brasiliensis*. imunodiagnóstico. Sorologia.

ABSTRACT

Introduction: Sporotrichosis is the most prevalent implantation mycoses. It is caused by several species of thermo-dimorphic fungi, belonging to the genus *Sporothrix*. Currently, in Brazil, most cases of sporotrichosis are due to *Sporothrix brasiliensis*, transmitted by infected cats (*Felix catus*). The standard diagnosis of sporotrichosis is by isolation in culture, since direct mycological and histopathological exams have a sensitivity of less than 30%. Although there are validated immunodiagnostic tests for sporotrichosis, currently none of them are commercially available in Brazil. The present work has as main objective, to evaluate the specificity and sensitivity of the latex particle agglutination test (LA), sold outside Brazil, in serum samples from patients with feline transmission sporotrichosis. **Methods:** 154 serum samples were used, classified into three groups: patients with sporotrichosis (n = 45), patients with other mycoses (n = 57) and healthy individuals (n = 52). The samples aliquoted and kept at -20 ° C, were evaluated using commercial kits from the LA-*Sporothrix* test from the North American laboratory IMMY, according to the manufacturer's instructions. The test readings were performed in duplicate, consisting of a visual interpretation of the reaction intensity of the samples. For statistical analysis, Excel® software was used. **Results:** 18.34% of false positive reactions were observed in titers of up to 1:8 (19 individuals in the control group and 4 in the group with other mycoses). The test had a sensitivity of 33.3%, a specificity of 93.6% and an accuracy of 76% when considering only reactions with titers $\geq 1:8$. **Conclusion:** Although with low sensitivity, the LA-*Sporothrix* test can be used correlated to the clinical-epidemiological diagnosis. It is also suggested to consider as reagents only samples with titrations equal to or greater than 1:8.

Keywords: Sporotrichosis. *Sporothrix brasiliensis*. Immunodiagnosis. Serology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA	14
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo geral	14
1.2.2 Objetivos específicos.....	14
1.3 METODOLOGIA.....	15
1.3.1 Desenho do estudo	15
1.3.2 Considerações Éticas.....	16
1.3.3 Local Do Estudo	16
1.3.4 Critérios de inclusão	16
1.3.5 Critérios de exclusão	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	17
2.2 ESPOROTRICOSE	18
2.3 DIAGNÓSTICO	20
2.3.1 Clínico-Epidemiológico.....	20
2.3.2 Micológico	20
2.3.3 Histopatológico	21
2.3.4 Imunológico	21
2.3.5 Moleculares	22
2.3.6 Espectrometria de massa.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	26
3.2 REAGENTES	26
3.3 PROCESSAMENTO E LEITURA DO TESTE	26
3.4 REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE	27
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	28
5 CONCLUSÃO	35
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE 1 – RESULTADOS DO TESTE LA-SPOROTHRIX GRUPO 1	44

APÊNDICE 2 – RESULTADOS DO TESTE LA-SPOROTHRIX GRUPO 2.....	46
APÊNDICE 3 – RESULTADOS DO TESTE LA-<i>SPOROTHRIX</i> GRUPO 3.....	48
ANEXO 1 – BULA DE REALIZAÇÃO DO TESTE LA-SPOROTHRIX.....	50
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	53

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de implantação, também classificada como subcutânea, causada pelo fungo termo dimórfico do gênero *Sporothrix*, que se apresenta na forma filamentosa entre 28-30°C e leveduriforme a 37°C (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; ZHANG *et al.*, 2011). A maioria das espécies patogênicas de *Sporothrix* spp., como *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei*, é transmitida através de traumas relacionados a plantas ou a seus subprodutos. (RODRIGUES *et al.*, 2016; MADRID *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Ocasionalmente, essas espécies podem ser transmitidas por uma variedade de animais (transmissão zoonótica), como tatus, aves, roedores, cães, equinos, peixes e insetos, porém o maior responsável pela transmissão zoonótica da esporotricose é o gato doméstico (*Felis catus*) (KWONCHUNG, BENNETT, 1992).

A partir da década de 1990, a espécie *S. brasiliensis* emergiu no estado do Rio de Janeiro, como principal agente de esporotricose de transmissão felina, e atualmente, causa uma epizootia da doença que atinge milhares de humanos, felinos e algumas centenas de cães (RODRIGUES *et al.* 2020). Em anos recentes, a esporotricose de transmissão felina (ETF), ultrapassou as fronteiras do Brasil, e atingiu países limítrofes, como a Argentina e Paraguai (BARROS *et al.*, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2017).

O *Sporothrix brasiliensis* é transmitido diretamente na fase leveduriforme, através de traumas relacionados a mordeduras, arranhaduras ou pelo contato com secreções de lesões ulcerativas de animais doentes (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2011).

Embora a esporotricose não seja uma doença de notificação compulsória, existem relatos de casos nos Estados Unidos, na América do Sul, na Ásia e na Austrália (BARROS *et al.*, 2011). Em algumas áreas, a doença é considerada hiperendêmica como por exemplo o Japão que registrou pelo menos 155 casos por ano no período de 1946 a 1982 (FUKUSHIRO, 1984); o Peru que teve incidência de 48-98 casos entre 100.000 pessoas (PAPPAS *et al.*, 2000); o México que possui ocorrência de 25 casos em 1000 habitantes (BONIFAZ *et al.*, 2013); e o Brasil que recentemente relatou 2.200 casos de esporotricose humana num período de 11 anos (BARROS *et al.*, 2010). A Europa registrou no passado muitos casos, porém atualmente tem a esporotricose como doença de ocorrência rara. Em locais como a África, por exemplo, existem

poucos registros da doença pois segundo Chakrabarti *et al.*, (2014) uma possível explicação é a falta de laboratórios especializados para diagnóstico correto da doença. Na China, a região norte é a mais afetada, tendo *S. globosa* como a espécie mais prevalente nessa região (YU *et al.*, 2013). Essa espécie também é preeminente na região da Índia, entretanto existem relatos de casos de esporotricose pulmonar causados por *S. luriei* (PADHYE *et al.*, 1992).

O primeiro relato de esporotricose no Brasil foi descrito por Lutz e Splendore (1907) onde, até então, era considerada uma doença ocupacional, atingindo principalmente jardineiros, agricultores e indivíduos que manipulavam solo e vegetais. Na década de 1950, Floriano de Almeida e colaboradores (1955), descreveram o primeiro caso de Esporotricose de Transmissão Felina (ETF) em São Paulo, porém a doença se manteve estável até a década de 90, quando o Rio de Janeiro emitiu alerta sobre o aumento na frequência de casos de ETF (RODRIGUES *et al* 2020). Barros *et al.* (2001) descrevem que no período de 1987 a 1998 foram diagnosticados apenas 12 casos de esporotricose humana no Serviço de Dermatologia Infecciosa do Centro de Pesquisas do Hospital Evandro Chagas (RJ), de 1998 a 2000 foram registrados 66 casos humanos, um aumento de aproximadamente 82% em apenas dois anos. O mesmo autor ainda relata o diagnóstico de 117 gatos e 7 cães, dos quais 84 pertenciam a pelo menos 33 residências de humanos com a doença. Ainda existe a dificuldade de se estimar a proporção da dessa epidemia/epizootia, pois fatores como a falta de notificação impossibilitam a visualização da verdadeira extensão da doença, uma vez que poucos estados possuem notificação compulsória.

Em 2007, Marimon *et. al.* através de análise molecular, descreveram a espécie *Sporothrix brasiliensis*, embora estudos anteriores já relatassem informações sobre a existência de diferenças na morfologia dos conídios pigmentados sésseis e na assimilação de sacarose, rafinose e ribitol entre *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, somente em 2013 ela foi relacionada a ETF (MARIMON *et al.*, 2007). A doença já atingiu 25 dos 26 estados brasileiros (RODRIGUES *et al.*, 2020), em algumas regiões como São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul ela já é classificada como epidemia (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Em 17 de fevereiro de 2020 foi publicada a portaria nº 264 que incluiu a esporotricose humana na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública, porém em 18 de maio de 2020 a portaria nº 1.061 artigo 4º revoga integralmente a mesma (BRASILa, 2020; BRASILb, 2020).

A manifestação clínica da esporotricose depende de fatores como o estado imunológico do paciente, quantidade de inóculo, espécie do agente etiológico e a virulência do fungo, porém as lesões comumente são restritas ao tecido cutâneo, subcutâneo e vasos linfáticos, em casos excepcionais pode ocorrer a forma disseminada ou ainda sistêmica, decorrente da inalação de propágulos do fungo (BARROS *et al.*, 2010). As lesões são classificadas como cutâneas ou linfocutâneas, incluindo pápulas, nódulos e úlceras e outras consideradas atípicas como envolvimento ocular, doença disseminada, doença do sistema nervoso central (SNC) e formas imunoreativas (ROSSOW *et al.*, 2020; LOPES-BEZERRA, SCHUBACH E COSTA, 2006).

O diagnóstico da doença é realizado de acordo com o Guia para manejo da esporotricose do Ministério da Saúde (em publicação), podendo ser classificado em possível, provável ou provada (Quadro 1).

O método laboratorial de referência para diagnóstico de esporotricose é o isolamento do fungo em cultura, porém outros métodos também são empregados como o micológico direto e histopatológico, mesmo apresentando baixa sensibilidade (HAY *et al.*, 2019). Métodos sorológicos como aglutinação de partículas de látex e ELISA já foram validados, porém o único comercialmente disponível é o teste de látex apresentando sensibilidade de 100% para doença disseminada, 86% para articular, 73% para pulmonar e 56% para cutânea tendo como princípio a pesquisa de anticorpos *S. schenckii* (IMMY, 2016). O teste de ELISA para pesquisa de anticorpos contra *S. brasiliensis* apresenta sensibilidade de 89% especificidade de 82% (ENGEMANN, 2009).

Tendo em vista os métodos disponíveis, e levando em consideração os muitos casos de ETF não são diagnosticados laboratorialmente, a pesquisa objetiva avaliar um método sorológico de diagnóstico que seja específico e sensível, visando rapidez e confiabilidade na obtenção do resultado, principalmente nas manifestações atípicas como as formas imunorreativas, pulmonares, ósteo articulares e meníngeas.

QUADRO 1: CLASSIFICAÇÃO DA ESPOROTRICOSE RELACIONADA A EVIDÊNCIAS EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS E LABORATORIAIS.

Níveis de evidência	Epidemiologia	Clínica	Laboratório
Possível	História prévia de trauma com plantas ou subprodutos vegetais, solo ou gatos (doentes ou não);	Manifestações clínicas das formas cutâneas, mucosas ou extracutâneas da esporotricose	Ausente
Provável	História prévia de trauma com plantas ou subprodutos vegetais, solo ou gatos (doentes ou não);	Manifestações clínicas das formas cutâneas, mucosas ou extracutâneas da esporotricose	A - Exame micológico direto e/ou histopatológico com elementos fúngicos sugestivos de <i>Sporothrix</i> sp.* B – Nos casos de esporotricose de transmissão felina, dados laboratoriais comprovando o diagnóstico no animal transmissor**
Provada	História prévia de trauma com plantas ou subprodutos vegetais, solo ou gatos (doentes ou não);	Manifestações clínicas das formas cutâneas, mucosas ou extracutâneas da esporotricose	Cultura positiva para <i>Sporothrix</i> sp.
Descartada	História prévia de trauma com plantas ou subprodutos vegetais, solo ou gatos (doentes ou não);	Manifestações clínicas das formas cutâneas, mucosas ou extracutâneas da esporotricose	Cultura negativa*** para <i>Sporothrix</i> sp. e/ou diagnóstico microbiológico e/ou histopatológico comprovado de outra doença

FONTE: Adaptado do Guia para manejo da esporotricose, Grupo Técnico de Micoses - Ministério da Saúde do Brasil (em publicação).

* Presença de células leveduriformes arredondadas, ovaladas, alongadas ou em forma de “charuto ou navete”. Presença de corpos asteroides.

** Exame citopatológico ou histológico com grande quantidade de elementos fúngicos sugestivos de esporotricose com ou sem cultura positiva.

*** Cultura negativa isoladamente não descarta o diagnóstico (pode haver contaminação por fungos não patogênicos e bactérias e limitação de sensibilidade do método).

1.1 JUSTIFICATIVA

Segundo Rodrigues *et al.*, (2020), o surgimento de *S. brasiliensis* pode ser visto como uma ameaça aos humanos e a saúde animal. Atualmente, é possível observar diversas formas clínicas atípicas da doença, as quais por diferir das manifestações clássicas, são facilmente confundidas com outras patologias. Muitos destes casos não possuem diagnóstico confirmado, devido à dificuldade de obtenção da amostra, como a biópsia, que se torna inviável pelo custo ou mesmo pela necessidade de profissionais especializados para realização desse procedimento. Consideramos ainda a baixa sensibilidade dos exames micológico direto e histopatológico, aliadas às dificuldades em se obter cultura em todos os casos, trazendo o atraso no diagnóstico e tratamento de pacientes com ETF. Além disso, nem todos laboratórios dispõem de estrutura física ou de equipe capacitada para identificação fúngica, assim como nem todos profissionais da área de saúde estão aptos a diagnosticar as diferentes e atípicas formas clínicas da esporotricose.

Com isso, justifica-se a importância dessa pesquisa, uma vez que a facilidade na obtenção do soro - quando comparado a uma biópsia, e a praticidade na realização do teste, o qual não requer equipamentos, insumos ou habilidades complexas, pode trazer a confirmação de diversos casos hoje diagnosticados como possíveis/prováveis, visando principalmente aquelas formas atípicas da doença vindas com o surgimento de *S. brasiliensis*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Determinar a performance de um teste sorológico para diagnóstico da ETF, utilizando o método de aglutinação de partículas de látex.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade e especificidade do teste de látex para diagnóstico da ETF em amostras de soro de pacientes com diagnóstico da doença, de pacientes com outras micoses e em voluntários sadios.

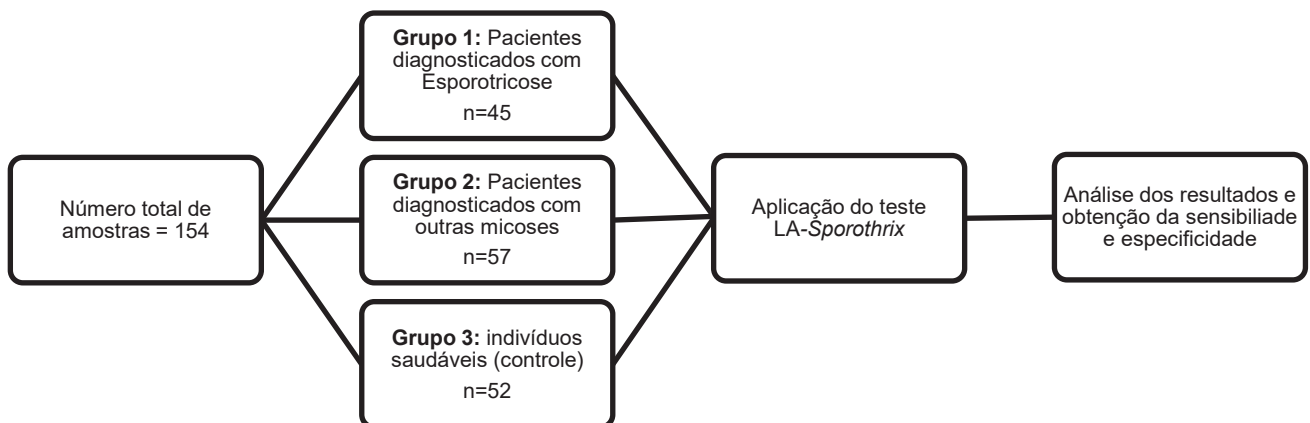
- Correlacionar a forma clínica com os resultados do teste;

1.3 METODOLOGIA

1.3.1 Desenho do estudo

Estudo prospectivo experimental, transversal e de acurácia que utiliza como material biológico amostras de soro. O teste de aglutinação por partículas de látex revestidas com antígeno de *Sporothrix schenckii* (LA-*Sporothrix*) - IMMY (Immunology) Norman, Oklahoma, Estados Unidos da América (E.U.A) foi fornecido de forma gratuita pela empresa fabricante. O teste seguiu a seguinte aplicação:

FIGURA 1: DESENHO DO ESTUDO



FONTE: Autor (2020).

Todos os pacientes e voluntários sadios foram recrutados no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC/UFPR) e concordaram em participar da pesquisa por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

1.3.2 Considerações Éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), sob o número CAAE 12379819.4.0000.0096. Para utilização das amostras foi necessária a permissão do participante via aceite e assinatura do TCLE.

1.3.3 Local Do Estudo

A pesquisa foi realizada nas dependências da Unidade Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do CHC/UFPR, no setor de Micologia, no período de 05/03/2018 à 05/03/2020.

1.3.4 Critérios de inclusão

- Pacientes do grupo 1 com diagnóstico provado ou provável de ETF, conforme critérios estabelecidos no quadro 1; independente da forma clínica;
- Pacientes do grupo 2 com diagnóstico de outras micoses de implantação, sistêmicas ou oportunistas, comprovados laboratorialmente, através de exame micológico direto, cultura e/ou exames imunológicos;
- Voluntários grupo 3, indivíduos saudáveis;
- Aceite em participar da pesquisa mediante assinatura do TCLE;
- Incluídos pacientes e voluntários independentes de sexo e idade.

1.3.5 Critérios de exclusão

- Pacientes com ETF provada ou provável, em tratamento por mais de 30 dias;
- Pacientes com ETF possível;
- Pacientes com esporotricose não transmitida por felinos (sapronótica);
- Voluntários do grupo 3 que possuíssem contato direto com felinos que tinham acesso livre às ruas ou com algum tipo de lesão sugestiva de micose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

O patógeno foi isolado pela primeira vez por Benjamin Schenck, em 1896, nos Estados Unidos da América (EUA), a partir da secreção produzida por lesões na mão e no braço direito de um paciente. Esse isolado foi estudado pelo micologista Erwin Smith o qual identificou como sendo um fungo do gênero *Sporotrichum* (HEKTOEN; PERKINS, 1900). O segundo caso, isolado por Hektoen & Perkins, trouxe o nome dado hoje ao principal patógeno, *Sporothrix schenckii* o qual foi isolado de um menino que obteve uma lesão após um ferimento com um martelo, também nos EUA (HEKTOEN; PERKINS, 1900).

Em 1907, foi registrado o primeiro caso de infecção por *S. schenckii* em animais, além da descoberta da possibilidade de cultivar a levedura *in vitro* por Lutz e Splendore, no Brasil (LUTZ; SPLENDORE, 1907). Desde então, foram identificados casos humanos relacionados com o contato direto com o fungo presente na natureza nos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Acre e Pernambuco (SCHUBACH *et al.*, 2005; DONADEL *et al.*, 1992). Em 1998, foi relatado um surto de esporotricose transmitida por gatos domésticos, no Rio de Janeiro (BARROS *et al.*, 2001) e, em 2006, pesquisadores brasileiros também demonstraram a presença da doença em cães de rua nesta mesma cidade, evidenciando seu papel na transmissão zoonótica (SCHUBACH *et al.*, 2006).

As espécies do gênero *Sporothrix* spp. compreendem fungos que apresentam termodimorfismo, ou seja, existindo na forma filamentosa ou miceliana em temperatura ambiente de 25-30°C, transformando-se na forma leveduriforme por dimorfismo quando incubados a 35-37°C, ou quando em vida parasitária, no organismo de mamíferos (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2013).

Em classificação taxonômica recente, o gênero *Sporothrix* está agrupado na classe Sordariomycetes, ordem dos Ophiostomatales (RODRIGUES *et al.*, 2020). Há várias espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*, a maioria pouco patogênica e de ocorrência ambiental. As espécies mais frequentemente relacionadas a patologia humana e animal são *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. brasiliensis* - este último sendo responsável pelo surto de transmissão zoonótica iniciado na década de 1990,

no Estado do Rio de Janeiro e que atualmente acomete milhares de pacientes humanos e felinos, além de centenas de cães (RODRIGUES *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2015; ZHAO *et al.* 2015; SASAKI *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2013).

As espécies de *Sporothrix* podem também apresentar fatores de virulência, como a secreção de compostos tóxicos por vesículas extracelulares, adesão, dimorfismo térmico, produção de melanina, termotolerância e a composição da parede celular (RODRIGUES *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008; KLEIN; TEBBETS, 2007; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

2.2 ESPOROTRICOSE

A esporotricose ocorre principalmente em áreas endêmicas, em países localizados em zonas tropicais e subtropicais (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017; CHAKRABARTI *et al.*, 2014). Na África na década de 40, houve o maior surto de esporotricose que atingiu aproximadamente três mil trabalhadores de uma mina, sendo que a infecção foi atribuída as madeiras das vigas de sustentação contaminadas (QUINTAL, 2000).

Queiroz-Telles *et al.*, (2017) relata que na América Latina, a esporotricose é a micose de implantação mais comum, sendo o Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela e Argentina as áreas de maior endemicidade. No Brasil, o maior número de casos está concentrado na região sul e sudeste, sendo que o Estado do Rio de Janeiro é considerado hiperendêmico (GREMIAO *et al.*, 2014). Segundo Rodrigues *et al.* (2014), casos de esporotricose são relatados desde 1997 no nordeste do país, tendo casos registrados em Pernambuco, Rio Grande do Norte, Alagoas e Paraíba (ARAUJO; LEAL, 2016; FILGUEIRA, 2009; MARQUES-MELO *et al.*, 2014; NUNES *et. al.* 2011). Atualmente municípios do estado do Rio de Janeiro e outras regiões do Brasil, enfrentam o maior surto epidêmico de esporotricose da história (RODRIGUES & ALBUQUERQUE, 2018).

No Brasil, ocorrem duas formas de transmissão da doença: esporotricose de transmissão vegetal, causada pelo *S. schenckii* sensu stricto que ocorre quando os conídios são veiculados por traumas com vegetais e a esporotricose de transmissão felina (ETF), relacionada ao *S. brasiliensis* (RODRIGUES, 2010). A ETF é mais prevalente no Brasil, ocorrendo sob forma surto epizoonótico, acometendo

principalmente humanos, gatos e cães (SCHUBACH; BARROS; WANKE, 2008; RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2016). O atual surto de ETF originou-se em municípios da baixada fluminense na década de 90 e continua em expansão, alcançando novas regiões e países, como é o caso da Argentina (BARROS *et al.*, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2015), Paraguai (DUARTE *et al.*, 2017), Colômbia (FLÓREZ-MUÑOZ *et al.*, 2018), Peru (SOTO *et al.*, 2015) e Venezuela (CAMACHO *et al.*, 2015).

Em felinos a apresentação clínica ocorre de três formas: cutânea localizada ou fixa, forma cutâneo-linfática e a forma disseminada ou sistêmica, e em casos mais graves da doença podem ser registradas lesões na cavidade nasal e no trato respiratório superior (IMAGEM 1 - E) (DUANGKAEW *et al.*, 2019).

Na infecção por *S. brasiliensis* em humanos, a inoculação de leveduras ocorre diretamente pelo contato com gatos infectados, os quais possuem alta carga fúngica em suas lesões. Segundo Queiroz-Telles *et al.* (2017), esse contato pode ser traumático através de arranhadura e mordedura, porém já foram registradas formas de transmissão não traumáticas, como a tosse, espirro ou secreção de gatos contaminados que entraram em contato direto com a pele íntegra ou mucosa de pacientes (QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019; ROSSOW *et al.*, 2020).

A apresentação clínica da esporotricose humana pode variar de acordo com a condição imunológica do hospedeiro e a patogenicidade do agente etiológico (CURTIELLAS-PIÑOL *et al.*, 2019). Recentemente Rossow *et al.* (2020) classificou as manifestações clínicas da esporotricose como lesões cutâneas ou linfocutâneas (IMAGEM 1 – B e C), que incluem pápulas, nódulos e úlceras, e outras consideradas atípicas, como envolvimento ocular (IMAGEM 1 - D), doença disseminada, doença do sistema nervoso central (SNC) e reações de hipersensibilidade.

Em casos de esporotricose extracutânea, a fonte de infecção pode ser desconhecida e já foram relatadas disseminação via hematogênica (MAHAJAN, 2014). Essas lesões podem ocorrer também na mucosa nasal, conjuntiva, pulmonar, osteoarticular e casos sistêmicos (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). Reuniram (Moreira, Freitas e Lamas, 2015) em uma revisão de literatura, dez casos de meningite por *Sporothrix* spp. todos relacionados a pacientes portadores de HIV. Mialski *et al.* (2018) relatam dois casos de meningite crônica causados por *Sporothrix brasiliensis* em indivíduos imunocompetentes, uma vez que é uma forma atípica da

doença, o diagnóstico foi tardio pois não apresentou evidências clínico-laboratoriais conclusivas ou histórico epidemiológico sugestivo.

2.3 DIAGNÓSTICO

2.3.1 Clínico-Epidemiológico

O diagnóstico clínico das formas cutânea e linfocutânea da esporotricose deve ser realizado descartando patologias infecciosas e não infecciosas prevalentes no Brasil, incluindo cromoblastomicose, micetomas, paracoccidiodomicose, histoplasmose, tuberculose cutânea, leishmaniose tegumentar, câncer de pele, psoríase, entre outras (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003; TIRADO-SÁNCHEZ; BONIFAZ, 2018). O padrão diagnóstico de referência da esporotricose é o isolamento do fungo em cultura (ARENAS *et al.*, 2018). Algumas características clínicas e epidemiológicas também são consideradas relevantes na anamnese feita pelo clínico, visto que a disseminação linfagítica da doença é representativa (HAY *et al.*, 2019). O diagnóstico da doença é classificado segundo o Guia para manejo da Esporotricose do Ministério da Saúde (em publicação), sendo diferenciado pelo diagnóstico laboratorial, como apresentado no quadro 1.

2.3.2 Micológico

Segundo Rossow *et al.*, (2020) e Arenas (2018), o exame micológico direto utilizando hidróxido de potássio (KOH) apresenta baixa sensibilidade 1-2% para esporotricose humana, porém, quando positivo são visualizadas células leveduriformes ovais/alongadas medindo aproximadamente 2-6µm. Algumas colorações especiais também podem ser empregadas na visualização de células leveduriformes no material como coloração de Gram (IMAGEM 2 - C), Grocott e Giemsa (LACAZ *et al.*, 2002).

O padrão de diagnóstico é o isolamento do *Sporothrix* spp. em cultura, realizado em geral, a partir de biópsia ou secreção de lesão utilizando a técnica de semeadura (ROSSATO, 2017). Em meio de cultura utilizando os meios Sabouraud, *Mycosel* ou *Brain Heart Infusion* (BHI), numa temperatura de 25-30°C, observam-se colônias inicialmente brancas, semelhantes a leveduras, podendo durante o

crescimento adquirir pigmentação escura e tornar-se membranosa, num tempo médio de 4-15 dias, variando de acordo com a espécie e carga fúngica (IMAGEM 2 - A) (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; HESSLER, KAUFFMAN, CHOW, 2016; OYARCE *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2015).

Em microscopia, obtida a partir de microcultivo, podem-se observar hifas delgadas, septadas e ramificadas com conidióforos alongados, simpodiais, desenvolvendo conídios piriformes, com disposição floral, lembrando margaridas (IMAGEM 2 - B) (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; KWON-CHUNG, BENNETT, 1992).

Pode-se realizar a reversão da forma filamentosa ao cultivar o fungo em ágar BHI a 37°C (ARENAS *et al.*, 2018). Embora a cultura seja classificada como padrão de referência, algumas limitações devem ser consideradas, principalmente em relação a coleta da amostra, pois em locais como unidades básicas de saúde (UBS) os recursos são limitados (HAY *et al.*, 2019). De acordo com o mesmo autor, o exame por microscopia direta para casos de esporotricose não é apropriado, porém deve ser realizado em conjunto com a histopatologia para exclusão de síndromes semelhantes.

2.3.3 Histopatológico

Para histopatologia, raramente são identificadas estruturas fúngicas no tecido, devido à baixa carga fúngica (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Para melhor visualização, recomenda-se a utilização de colorações como ácido periódico-Schiff (PAS) (IMAGEM 2 – D) e hematoxilina-eosina (HE) podendo ser observado "corpos asteróides", região eosinofílica ao redor do fungo, sugestivo de esporotricose, mas que não a caracteriza, uma vez que pode ser observado em outras doenças granulomatosas ou infecciosas, como sarcoidose e lacaziose (MORRIS-JONES, 2002; AUNG, SPELMAN, THOMPSON, 2015; CONTI-DÍAZ, 1989).

2.3.4 Imunológico

Para diagnóstico sorológico da esporotricose são validados método de reação imunoenzimática (ELISA) e a reação de aglutinação por partículas de látex, porém ambos possuem disponibilidade restrita no Brasil (BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2014; BRASIL, 2019).

Blumer *et al.* (1973), utilizando antígeno filtrado de cultura de *Sporothrix schenckii*, comparou cinco métodos sorológicos de diagnóstico para esporotricose: aglutinação com partículas de látex, aglutinação em tubo, teste de fixação do complemento, imunodifusão e um teste utilizando anticorpo fluorescente. A maior sensibilidade apresentada foi da aglutinação em tubo, com 96%, seguidos da aglutinação em látex com 94%, fixação do complemento e imunodifusão com 68% e 55%, respectivamente. O teste utilizando anticorpo fluorescente obteve sensibilidade geral de 90%, variando dentre as diferentes formas clínicas. A especificidade dos testes de aglutinação foi de 100%, os demais obtiveram especificidade acima de 90%.

Bernardes-Engemann *et al.* (2014), validou um teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para diagnóstico da esporotricose, utilizando o antígeno SsCBF. A partir de 177 amostras de soro de pacientes com esporotricose, confirmados com exame micológico ou cultura, obteve-se sensibilidade de 89%. Para avaliação da especificidade, o estudo incluiu 77 amostras de pacientes com outras micoses, 15 amostras de pacientes com infecções não fúngicas e 38 amostras de indivíduos saudáveis, obtendo especificidade de 82%. Segundo o autor, o ELISA é uma ferramenta precisa para o diagnóstico diferencial de esporotricose e que pode ser disponibilizado para uso de rotina.

2.3.5 Moleculares

Outros métodos de diagnóstico são baseados em técnicas de biologia molecular, como é o caso do sequenciamento de DNA. A identificação de isolados pode ser feita através da amplificação e sequenciamento da região ITS. Zhou e colaboradores (2013), em um de seus trabalhos, conclui que a região ITS é suficiente para identificação e diferenciação de espécies clinicamente relevantes de outras espécies do mesmo gênero/família. Rodrigues *et al.* (2016), acrescenta que embora a região ITS seja utilizada como código primário de identificação, em espécies crípticas faz necessário o uso de genes codificadores de proteínas para seu reconhecimento, como o gene da calmodulina, β -tubulina e fator de alongamento da tradução (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; ROSSATO, 2017).

2.3.6 Espectrometria de massa

A identificação também pode ser feita por espectrometria de massa, através do MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*), o qual gera um espectro característico com base no perfil proteômico (ARENAS *et al.*, 2018). Oliveira *et al.* (2015), utilizou 70 isolados clínicos e ambientais do complexo *Sporothrix* com sequenciamento parcial do gene da calmodulina (CAL) para serem identificados por MALDI-TOF no sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK). Para identificação foi estabelecido um banco de dados de referência, segundo orientações do fabricante, com alguns ajustes. As espécies de *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix luriei* e *Sporothrix pallida*, foram todas identificadas a nível de espécie, conforme confirmado pelo sequenciamento. Outros autores também utilizaram a ferramenta MALDI-TOF e a descrevem como uma metodologia simples, confiável e rápida na identificação de rotina de espécies do complexo *Sporothrix* (MATOS *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

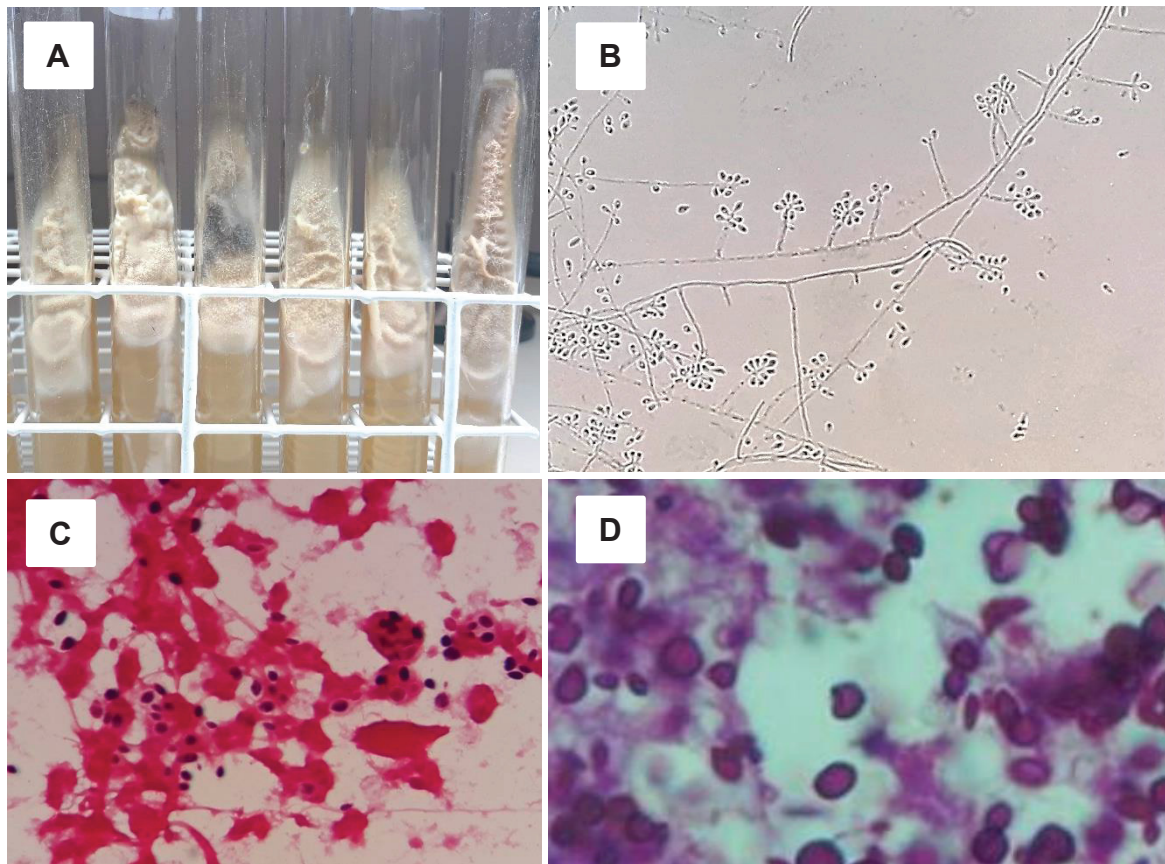
IMAGEM 1 – ASPECTOS CLÍNICOS DA ESPOROTRICOSE HUMANA E FELINA



FONTE: Autor (2019).

LEGENDA: Aspectos clínicos da esporotricose humana em pacientes do ambulatório de micoses do CHC-UFPR (A) Forma cutâneo-fixa (Autor,2019); (B-C) Forma linfocutânea (Autor,2019); (D) Forma ocular, caracterizando conjuntivite granulomatosa (Autor,2019); (E) Paciente felino com forma disseminada da doença, mostrando lesões ulceradas e vias aéreas superiores caracterizando “nariz de palhaço” (FONTE: gentilmente cedida por paciente do CHC/UFPR)

IMAGEM 2 – ASPECTOS DIAGNÓSTICOS DA ESPOROTRICOSE HUMANA E FELINA



FONTE: Autor (2019).

LEGENDA: Aspectos macromorfológicos (A) e micromorfológicos em aumento de 400x (B), de cultivos de *S. brasiliensis*, na fase micelial (Autor, 2019). Exame citopatológico de esfregaço de lesão felina, mostrando várias células leveduriformes de *S. brasiliensis* (C), coloração de gram x400 (Autor, 2019); (D) Biópsia de pele de paciente com AIDS e forma disseminada de esporotricose do CHC-UFPR, com esporotricose associada a AIDS. PAS x600 (CARVALHO *et al.*, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras de soro foram obtidas de pacientes do CHC-UFPR e de voluntários saudáveis na mesma Instituição. O material foi coletado seguindo a técnica de coleta a vácuo em tubo de sorologia (9mL) com ativador de coágulo. Após coletadas, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, e se não processadas imediatamente, as amostras foram alíquotadas em triplicata e armazenadas à -20°C.

3.2 REAGENTES

Foram utilizados kits diagnósticos LA-*Sporothrix* (REF SL 1001) IMMY (bula em ANEXO), mantidos sob refrigeração entre 2°C a 8°C. O kit LA-*Sporothrix* é composto pelo diluente da amostra que é uma solução salina tamponada com glicina (10x) concentrada (pH 8,6) contendo albumina e conservante; controle positivo sendo soro liofilizado de coelhos imunizados com antígenos de *S. schenckii* e conservante; controle negativo sendo soro normal de cabra contendo conservante; látex que provém de conservante mais a suspensão padronizada de partículas de látex revestidas por adsorção passiva com antígeno de *Sporothrix schenckii* (ATCC 58251), o qual é obtido através do extrato bruto da cultura na fase filamentosa, possuindo portanto epítomos de proteínas e carboidratos; e cartelas descartáveis de fundo escuro para leitura da reação. Foi necessária a reidratação do controle positivo em seu primeiro uso e sua posterior inativação por 30 minutos à 56°C.

3.3 PROCESSAMENTO E LEITURA DO TESTE

Inicialmente foi realizada a inativação da amostra a 56°C em termobloco por 30 minutos. O diluente de amostra foi diluído 1:10 em água destilada antes do uso. Após inativação, foi realizada diluição seriada da amostra utilizando a solução diluída. Para isso, foram dispostos 6 microtubos com identificação do paciente e a respectiva diluição de 1:2 a 1:64, sendo o volume de transferência igual a 100µL. Após a diluição da amostra, foi pipetado 25µL da diluição na cartela de aglutinação identificada,

juntamente com uma gota do látex previamente homogeneizado. As cartelas foram então levadas ao rotor por 10 minutos a 100 rpm. A leitura foi realizada imediatamente, com dupla conferência da intensidade da reação, a qual era comparada ao controle positivo do látex, que segundo a empresa, resulta em uma reação 2+ ou maior, e ao controle negativo, que deve resultar em uma reação menor que 1+ como mostra o quadro abaixo (Quadro 2). Nos casos em que a amostra apresentou titulação >1:64 prosseguiu-se a diluição enquanto o teste se mantinha reagente.

QUADRO 2: INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DO TESTE LA-*SPOROTHRIX*

Resultado	Aspecto para leitura
Negativo (-)	Uma suspensão homogênea de partículas sem agregação visível
Uma cruz (1+)	Granulação fina contra um fundo leitoso
Duas cruzes (2+)	Pequenos, mas definidos aglomerados contra um fundo ligeiramente nublado
Três cruzes (3+)	Aglomerados grandes e pequenos contra um fundo claro
Quatro cruzes (4+)	Grandes aglomerados contra um fundo muito claro

FONTE: Adaptado de IMMY (2016).

3.4 REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Para verificar a consistência dos resultados obtidos, uma profissional externa realizou os testes de repetitividade e reprodutibilidade. Para isso, foram utilizadas amostras dos três grupos selecionadas aleatoriamente, e seguiu-se o mesmo protocolo de processamento do LA-*Sporothrix*.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente com valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, probabilidade de falso positivo, probabilidade de falso negativo e razões de verossimilhança (positivo e negativo). Justifica-se que não foram calculados os valores preditivos positivo e negativo pois não existem estimativas disponíveis de prevalência da doença na população alvo do estudo. Os dados foram organizados e analisados usando o programa computacional MedCalc Software.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Para realização da pesquisa, foram coletadas no total 154 amostras, sendo 45 de pacientes com diagnóstico provável ou provado de ETF (grupo 1), 57 amostras com diagnóstico laboratorial confirmado de outras micoses de implantação, oportunistas e/ou sistêmicas (grupo 2) e 52 amostras do grupo controle. Dentre os indivíduos pertencentes ao grupo 1, as características clínicas-demográficas podem ser observadas na Tabela 1.

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS DOS PARTICIPANTES DO GRUPO 1.

Características	n	%
Sexo		
Masculino	16	35,56
Feminino	29	64,44
Diagnóstico		
Provado	10	22,22
Provável	35	77,78
Idade		
<10	2	4,44
10-17	5	11,11
18-30	9	20,00
30-60	20	44,44
>60	9	20,00
Forma Clínica		
Linfocutânea	30	66,67
Cutânea Fixa	9	20,00
Ocular	4	8,89
Imunoalérgica	1	2,22
Articular	1	2,22

FONTE: Autor, 2019.

No presente estudo observou-se que 64,44% dos pacientes com ETF eram do sexo feminino, semelhante aos estudos realizados por Barros *et al.* (2004) (68,0%), Almeida-Paes *et al.* (2007) (76,67%) e Oliveira *et al.* (2019) (58,1%), acredita-se que a maior prevalência pode ser explicada pela maior atividade doméstica e cuidado dos animais infectados.

Dentre os 45 pacientes incluídos no grupo 1, em apenas 10 (22,22%) o diagnóstico de ETF foi provado com isolamento do fungo em cultura, os demais casos foram classificados como prováveis. Entretanto, estudo realizado por Oliveira *et al.* (2019) obteve 54% de casos provados. Essa diferença justifica-se pelo fato de que devido ao aumento do número de casos de ETF, o diagnóstico se baseie apenas em evidências clínicas-epidemiológicas, não sendo requisitados exames laboratoriais. Estudo realizado por Hay *et al.* (2019), demonstrou que a frequente ausência de estruturas fúngicas presentes nos exames micológicos direto e histopatologia dificultam o diagnóstico rápido da esporotricose, sendo a cultura o principal método diagnóstico. Embora a forma linfocutânea da doença possa ainda ser confundida com outras micoses, Hay *et al.* (2019) não descarta a possibilidade do uso dos sinais clínicos como parte do diagnóstico, não considerando este como confirmatório. Para o diagnóstico provado é necessária uma coleta invasiva, sendo ela biópsia/aspirado da lesão, além de aguardar o tempo de crescimento do fungo no meio de cultura, existindo ainda a probabilidade de contaminação por outros microrganismos ou resultados falso-negativos devido à baixa carga fúngica (LACAZ *et al.*, 2002; VÁSQUEZ-DEL-MERCADO *et al.*, 2012; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2011).

Foram incluídos no grupo com ETF pacientes de todas idades, variando de 5 a 87 anos, sendo observado maior prevalência em adultos (64,44% - 18 a 60 anos). Tais resultados são semelhantes aos observados em outros estudos, onde a maior prevalência foi observada em adultos (BARROS *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2019; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007).

Dentre os participantes do grupo 1, observou-se que 30 (66,67%) apresentavam a forma linfocutânea da doença, corroborando demais estudos que mostram que essa é a forma clínica mais prevalente (ALVARADO *et al.*, 2015; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2004). A forma cutânea fixa representou 20,0% dos casos, semelhante ao trabalho realizado por Barros *et al.*, (2004) que obteve 25,3%. Embora sejam formas clínicas menos frequentes, o presente estudo incluiu ainda pacientes diagnosticados com ETF imunoalérgica (n=1), ETF articular (n=1) e ETF ocular (n=4), ainda que existam poucos casos reportados, têm se observado aumento no número de casos em regiões endêmicas (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Para o grupo de pacientes com outras micoses (grupo 2) as características epidemiológicas e clínicas podem ser observadas na tabela 2:

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES DO GRUPO 2.

Características	n	%
Sexo		
Masculino	36	63,1
Feminino	21	36,9
Diagnóstico		
Criptococose	18	31,5
Paracoccidiodomicose (PCM)	15	26,3
Candidemia	8	14
Histoplasmose	7	12,3
Aspergilose	4	7
Cromoblastomicose	1	1,7
Fusariose	1	1,7
Histoplasmose var. africana	1	1,7
Lobomicose	1	1,7
Peritonite por <i>Candida</i>	1	1,7

FONTE: Autor, 2019.

Devido às características de hospital de alta complexidade, foram incluídos no grupo 2 pacientes com diferentes infecções fúngicas, sendo as mais prevalentes criptococose (31,5%), seguido de PCM (26,3%) e candidemia (14,0%).

Segundo a empresa fabricante do kit diagnóstico, resultados falsos positivos poderiam ser observados em titulações de até 1:8, e sua classificação é realizada em cruces quando reagente (1+, 2+, 3+ ou 4+). A determinação do *cutoff* foi realizada através da análise dos resultados, avaliando a sensibilidade (S) e especificidade (E) obtidas com resultados reagentes $\geq 1:8$ (S= 33,3% E=93,6%) e considerando todos os testes reagentes, independente da titulação (S= 62,2% E= 77,9%). Ao verificar os testes reagentes do grupo controle observou-se 20 resultados falso positivos, dentre eles 16 com titulações entre 1:2 e 1:8 e 4 com titulação $>1:8$. Embora a sensibilidade tenha sido maior considerando todos resultados reagentes (S=62,2%), a especificidade foi inferior (77,9%), portanto, para evitar resultados falso-positivos sugere-se considerar como reagente no teste somente titulações $\geq 1:8$. Os parâmetros de validação diagnóstica podem ser observados no quadro 3, tendo sido considerada amostra reagente com titulação igual ou maior que 1:8.

QUADRO 3: PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DE TESTE DIAGNÓSTICO OBTIDOS PELO LA-
SPOROTHRIX CONSIDERANDO REAGENTE TITULAÇÃO $\geq 1:8$.

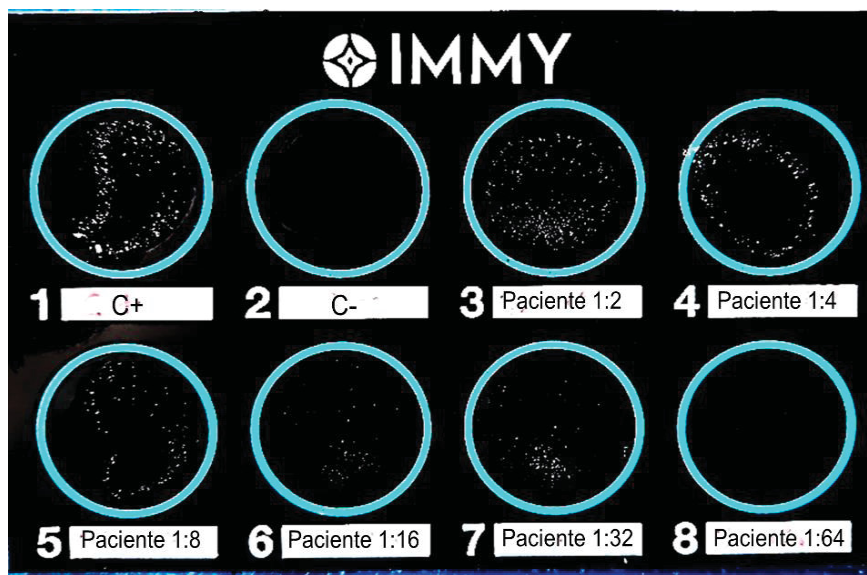
	Resultado	IC 95%
Sensibilidade	33,3%	19,6% - 47,1%
Especificidade	93,6%	89% - 98,2%
Acurácia	76,0%	69,2% - 82,7%
PF+:	6,4%	1,8% - 11,0%
PF-:	66,7%	52,9% - 80,4%

FONTE: Autor, 2019.

LEGENDA: Probabilidade de falso positivo (PF+); Probabilidade de falso negativo (PF-).

A imagem 3 demonstra a reatividade de um soro de paciente com titulação de 1:32 com diagnóstico provado de ETF, pelo método de aglutinação de partículas de látex utilizada no presente estudo.

IMAGEM 3: CARTELA DE REAÇÃO LA-SPOROTHRIX



FONTE: Autor (2019).

LEGENDA: Interpretação dos resultados: (1) Controle positivo (C+) - reagente; (2) Controle negativo (C-) - não reagente; (3) amostra de paciente - reagente em titulação de 1:2; (4) amostra de paciente - reagente em titulação de 1:4; (5) amostra de paciente - reagente em titulação de 1:8; (6) amostra de paciente - reagente em titulação de 1:16; (7) amostra de paciente - reagente em titulação de 1:32; (8) amostra de paciente - não reagente.

Considerando reagentes titulações $\geq 1:8$, a sensibilidade global do teste foi de 33,3%, valor inferior ao observado por Blumer *et al.* (1973) que ao comparar cinco métodos sorológicos de diagnóstico para esporotricose, concluiu que o método de aglutinação de partículas de látex seja em tubo ou em lâmina são os mais indicados

para implantação na rotina laboratorial, apresentando 94% de sensibilidade e 100% de especificidade. Bernardes-Engemann *et al.* (2014), ao validar um teste de ELISA, verificou 89% de sensibilidade e uma especificidade de 82% utilizando um antígeno específico (SsCBF). Ambos trabalhos utilizaram a forma leveduriforme de *Sporothrix schenckii* para obtenção do antígeno, diferindo da pesquisa em questão, uma vez que foi utilizado filtrado bruto da mesma espécie, porém em fase filamentosa.

Pode-se relacionar a baixa sensibilidade observada no presente estudo com o tipo de antígeno utilizado, uma vez que o teste de LA-*Sporothrix* utiliza antígeno de *S. schenckii* adsorvido nas partículas de látex, enquanto, para o teste, foram avaliados soros de pacientes com diagnóstico de ETF provado e provável, no qual a espécie envolvida é *S. brasiliensis*. A literatura descreve o SsCBF como principal fração antigênica do *Sporothrix* spp. (PENHA; BEZERRA, 2000). Dessa fração, são descritos alguns principais antígenos: gp58, gp70 e gp85, tendo gp70 presente nas fases leveduriforme e micelial de *Sporothrix* e outro antígeno categorizado como gp60 presente apenas nas células leveduriformes (LIMA; BEZERRA, 1997; RUIZ-BACA *et al.*, 2011).

Mais tarde, Rodrigues *et al.* (2015), mostrou que gp70 sofria modificações pós-traducionais, tendo em vista que proteínas variantes de tamanho entre 60-70kDa compartilhavam do mesmo peptídeo, concluindo que gp60 e gp70 eram o mesmo antígeno. Almeida-Paes *et al.* (2012), ao comparar a resposta de anticorpos induzida por *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, demonstrou que mesmo espécies diferentes possuem perfil antigênico semelhante, porém variações de cepas ou formas morfológicas poderiam reagir diferente frente a atividade antigênica. Rossato (2017), relata ainda que embora gp60 e gp70 sejam considerados o mesmo antígeno, a glicosilação pode induzir à diferentes respostas. A glicoproteína de 70kDa (gp70), é categorizada como uma adesina de *Sporothrix* (NASCIMENTO *et al.*, 2008) e ao analisar sua expressão, percebe-se que em leveduras de *S. brasiliensis* ela é pouco expressa, o que leva a relacionar sua quantidade com sua virulência (CASTRO *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2015). Portanto, antígenos espécie-específicos podem proporcionar desenvolvimento de um método sorológico rápido, não invasivo e altamente sensível para o diagnóstico, triagem e monitoramento do tratamento (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Como mencionado, o teste LA-*Sporothrix* foi desenvolvido a partir do filtrado de extrato bruto da cultura, ou seja, estão adsorvidos nas partículas de látex epítomos de

proteínas e carboidratos para captação específica de IgM, pois de acordo com o fabricante, imunoglobulinas diferentes de IgM não são tão eficazes na ligação entre as partículas sensibilizadas. Segundo Wordell (1991), a IgM é uma imunoglobulina que representa cerca de 10% dos anticorpos no soro. Esta imunoglobulina é a primeira a ser produzida durante a resposta imune primária a organismos infecciosos antigenicamente complexos, uma vez ligada ao seu homólogo, realiza a ativação da via clássica do complemento. Sua estrutura é pentâmera, fornecendo dez sítios de ligação idênticos, o que lhe confere mais força em suas ligações a estruturas homólogas, seja ela do próprio antígeno ou estruturas semelhantes.

Relacionando a isso, pode-se associar a baixa sensibilidade do teste com o tipo de imunoglobulina pesquisada, uma vez que, nem todas as amostras coletadas estavam dentro do período de meia vida da IgM, que é de aproximadamente dez dias, ou seja, quando coletada a amostra a imunoglobulina do tipo M já não estava em concentrações detectáveis no soro pelo método de aglutinação.

Almeida-Paes *et al.* (2007), determinou os níveis de imunoglobulinas dos isotipos A, M e G em pacientes com esporotricose antes e durante o tratamento com itraconazol, utilizando soro de pacientes com diferentes formas clínicas em teste de ELISA, tendo observado que IgM foi melhor detectado em pacientes com manifestação fixa da doença, apresentando resultados falso-negativos para outras formas. Como demonstra o quadro 4, a forma cutâneo-fixa foi a que possuiu menor sensibilidade nesse estudo, considerando ainda as formas imunoalérgicas e articulares que apresentaram sensibilidade nula por não apresentar reatividade no LA-*Sporothrix*, evidenciando melhor aplicação nas formas oculares e linfocutâneas.

QUADRO 4: APRESENTAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE LA-*SPOROTHRIX* RELACIONANDO AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS.

	Sensibilidade
Linfocutânea	33,33%
Cutânea-fixa	25,00%
Ocular	50,00%

FONTE: Autor, 2019.

* Foram incluídos na pesquisa apenas um caso de ETF Imunoalérgica e um caso de Esporotricose Articular, ambos com resultados negativos para o teste La-*Sporothrix* não contabilizando sensibilidade.

As reações reagentes no presente estudo com o grupo de outras micoses podem ser justificadas por reação cruzada devido a semelhança nos epítomos. Zancopé-Oliveira *et al.* (1999), ao caracterizar um antígeno de *Histoplasma capsulatum* verificou a existência de homologia entre a proteína codificada pelo gene M com catalases presentes em *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Eimericella nidulans*, deixando, portanto, epítomos suscetíveis a reações com anticorpos de outras infecções fúngicas. Além disso, Almeida-Paes *et al.* (2007) observou maior quantidade de reações cruzadas quando comparado o exoantígeno de *S. schenckii* com a imunoglobulina M e os resultados demonstraram que os testes de ELISA IgA e IgG são testes de alta precisão, enquanto ELISA IgM é classificado como moderado no imunodiagnóstico da esporotricose (ALMEIDA-PAES *et al.* 2007).

Foram observadas três amostras (5,26%) reagentes LA-*Sporothrix* para o grupo de outras micoses, sendo duas amostras de PCM e uma candidemia. Ressalta-se que as titulações observadas em duas das amostras foram reagentes a partir de 1:64 e até 1:2048, caracterizando o efeito prozona. Essas reações cruzadas possivelmente se devem a presença de epítomos semelhantes. Apesar de reações falso-positivas, a especificidade do teste ainda é considerada satisfatória, sendo igual a 93,6%.

Outros parâmetros calculados foram a repetibilidade e reprodutibilidade do teste, onde obteve-se um índice de concordância Kappa = 0,70 classificado como “substancial”, segundo a classificação proposta por Landis e Koch (1977). O resultado do teste foi discordante em duas amostras, sendo uma amostra do grupo 2 e outra do grupo 3. Podemos citar a subjetividade na interpretação do teste como uma possível explicação, uma vez que a aglutinação muitas vezes era discreta, induzindo a um resultado falso-negativo.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, conclui-se que o teste LA-*Sporothrix*, não apresenta aplicabilidade eficiente para casos de ETF, sendo que o mesmo apresentou sensibilidade de 33,3% - abaixo do esperado, uma vez que o objetivo seria apresentar um método rápido, eficaz e que trouxesse a mesma ou maior sensibilidade do padrão ouro. Conclui-se também que o teste apresenta maior aplicabilidade em formas atípicas, como no caso das formas oculares presentes no estudo, alcançando sensibilidade de 50% e comprovando os limites de sensibilidade já descritos pelo fabricante. Embora o teste apresente uma sensibilidade baixa, o mesmo pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da Esporotricose, uma vez que possui alta especificidade, porém sua interpretação deve ser relacionada com dados clínicos-epidemiológicos do paciente e ser realizado em tempo compatível com a presença de IgM no soro.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos, sugere-se o direcionamento do procedimento para metodologias mais sensíveis e específicas. Acredita-se que utilizando antígeno de *S. brasiliensis*, o qual é mais prevalente no Brasil, juntamente com um método de captura de anticorpos como imunocromatografia seja promissora para o diagnóstico sorológico da ETF.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA F de, SAMPAIO SA, LACAZ C da S, FERNANDES JC. Dados estatísticos sobre a esporotricose; análise de 344 casos [Statistical data on sporotrichosis; analysis of 344 cases]. **An Bras Derm Sifilogr**. 1955 Mar;30(1):9-12. Portuguese. PMID: 13238814.
- ALMEIDA, J. R. F. de *et al*. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 42-50, 22 dez. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myu049>.
- ALMEIDA-PAES, Rodrigo *et al*. Cell-free antigens of *Sporothrix brasiliensis*: antigenic diversity and application in an immunoblot assay. **Mycoses**, [S.L.], v. 55, n. 6, p. 467-475, 28 fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02175.x>.
- ALMEIDA-PAES, Rodrigo *et al*. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* Exoantigens in Patients with Sporotrichosis before and during Treatment with Itraconazole. **Clinical And Vaccine Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 1149-1157, 18 jul. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00149-07>.
- ALMEIDA-PAES, Rodrigo *et al*. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1-2, 18 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003094>
- ALVARADO, Primavera *et al*. Diagnóstico serológico de la esporotricosis mediante el empleo del antígeno de micelio de *Sporothrix schenckii* sensu stricto. **Invest. clín**, Maracaibo , v. 56, n. 2, p. 111-122, jun. 2015.
- ARAUJO, Adjanna Karla Leite; LEAL, Carlos Adriano de Santana. Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: relato de caso. **Pubvet**, [S.L.], v. 10, n. 11, nov. 2016. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v10n11.816-820>.
- ARENAS, Roberto *et al*. Sporotrichosis: from koh to molecular biology. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 62, 23 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof4020062>.
- AUNG, Ar; SPELMAN, Denis; THOMPSON, Philip. Pulmonary Sporotrichosis: an evolving clinical paradigm. **Seminars In Respiratory And Critical Care Medicine**, [S.L.], v. 36, n. 05, p. 756-766, 23 set. 2015. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1562901>.
- BARROS M. B. D. L. *et al*. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia [Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic]. **Rev Panam Salud Publica**. 2010;27(6):455-460.
- BARROS, M. B. D. L. *et al*. Cat-Transmitted Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 38, n.

4, p. 529-535, 15 fev. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/381200>.

BARROS, M. B. D. L. *et al.* *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 633-654, 1 out. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00007-11>.

BARROS, M. B. D. L. *et al.* Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 96, n. 6, p.777-779, ago. 2001. FapUNIFESP (SciELO).

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. *et al.* Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.28-33, 4 dez. 2014. Oxford University Press.

BLUMER, S O. *et al.* Comparative Evaluation of Five Serological Methods for the Diagnosis of Sporotrichosis. **Appl Microbiol.**, S/l, v. 21, n. 1, p.4-8, jul. 1973.

BONIFAZ, A *et al.* Prueba intradérmica con esporotricina en una comunidad de la Sierra Norte de Puebla. **Dermatol Rev Mex**, México, v. 57, n. 6, p. 428-432, dez. 2013. BRASIL. Constituição (2020). Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020. **Portaria Nº 264, de 17 de Fevereiro de 2020**. 35. ed. BRASIL, BR, 17 fev. 2020. Seção 1. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656> Acesso em: 18 fev. 2020a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. . **PORTARIA Nº 1.061, DE 18 DE MAIO DE 2020**. 2020. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt1061_29_05_2020.html. Acesso em: 23 out. 2020b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. . **Esporotricose Humana: sintomas, causas, prevenção, diagnóstico e tratamento**. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/esporotricose-humana> Acesso em: 16 nov. 2019.

CAMACHO, E *et al.* Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-2, 25 fev. 2015. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-0839-6>.

CARVALHO, Miriam Tomoko Mitsuno *et al.* Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 655-659, dez. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822002000600018>.

CASTRO, R A. *et al.* Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.756-756, 7 out. 2013.

CHAKRABARTI, A *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 3-14, 19 dez. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myu062>.

CONTI-DÍAZ, IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America: **Clin Exp Dermatol**: v. 108, n. 2, p. 113-116, set./1989.

CURTIELLAS-PIÑOL, V *et al.* Morphological changes and phagocytic activity during the interaction of human neutrophils with *Sporothrix schenckii*: An in vitro model. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 129, p.56-63, abr. 2019.

DONADEL, K. W. *et al.* Esporotricose na infância – Relato de dois casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 67, n. 3, p. 121-125, mai. 1992.

DUANGKAEW, L *et al.* Cutaneous sporotrichosis in a stray cat from Thailand. **Medical Mycology Case Reports**, [s.l.], v. 23, p.46-49, mar. 2019.

DUARTE, JMG *et al.* Sporotrichosis transmitted by domestic cat. A family case report. **Del Nacional**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 67-76, 30 dez. 2017. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. <http://dx.doi.org/10.18004/rdn2017.0009.02.067-076>.

ENGEMANN, A R B de S. **Validação, avaliação de impacto e análise da aplicabilidade de teste de ELISA no diagnóstico da esporotricose**. 2009. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, Departamento de Biologia Celular, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FERNANDES, G F *et al.* Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 241-249, abr. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.23112>.

FERNÁNDEZ, N *et al.* Esporotricosis; una zoonosis en alerta. (2015) 10.13140/RG.2.2.18927.74404.

FILGUEIRA, K D. Esporotricose Na Espécie Canina: relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, Rio Grande do Norte, v. 10, n. 2, p. 673-677, abr. 2009.

FLÓREZ-MUÑOZ, S. V. *et al.* Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of *Sporothrix schenckii* Complex in Medellín, Colombia. **Mycopathologia**, [s.l.], v. 184, n. 1, p.53-63, 15 dez. 2018.

FUKUSHIRO, R. Epidemiology and ecology of sporotrichosis in Japan. **Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A** ., Japão, v. 257, n. 2, p. 228-233, jul. 1984.

GREMIAO, I. D. F. *et al.* Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 15-21, 4 dez. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myu061>

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: cat to human transmission. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-1, 19 jan. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>.

HAY, R. *et al.* The Diagnosis of Fungal Neglected Tropical Diseases (Fungal NTDs) and the Role of Investigation and Laboratory Tests: An Expert Consensus Report: **Trop Med Infect Dis**: v. 4, n. 4, p. 122, set./2019.

HEKTOEN, L; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.77-89, 1 out. 1900. Rockefeller University Press.

HESSLER, C; KAUFFMAN, C A; CHOW, F C. The Upside of Bias. **The Neurohospitalist**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.30-34, 8 jul. 2016.

IMMY LA-Coccidioides, LA-Histoplasma, and LA-*Sporothrix* Antibody Systems. [Bula]. Norman, OK - U.S.A.: IMMY; 2018.

KLEIN, B S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Current Opinion In Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.314-319, ago. 2007. Elsevier BV.

KWON-CHUNG, KJ; BENNETT, JE **Medical mycology**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 866 p.

LACAZ, C.S *et al.* – **Tratado de Micologia médica**; 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p.

LANDIS JR; KOCH GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. 1977 Mar;33 (1):159-74. PMID: 843571.

LIMA, OC; LOPES-BEZERRA, LM. Identification of a concanavalin A-binding antigen of the cell surface of *Sporothrix schenckii*. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.167-172, jan. 1997. Oxford University Press (OUP).

LOPES-BEZERRA, LM.; SCHUBACH, A; COSTA, RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 78, n. 2, p.293-308, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

LUTZ, A; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, [S.L.], v. 10, n. 21, p. 443-450, nov. 1907.

MADRID, H *et al.* *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.218-222, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2009.02.005>.

MAHAJAN, VK. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. **Dermatology Research And Practice**, [s.l.], v. 2014, p.1-13, 2014. Hindawi Limited.

MARIMON, R. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 45, n. 10, p.3198-3206, 8 ago. 2007. American Society for Microbiology.

MARQUES-MELO, E H *et al.* Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de alagoas. **Revista Baiana Saúde Pública**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 490-498, 1 jun. 2014. Secretaria da Saude do Estado da Bahia. <http://dx.doi.org/10.5327/z0100-0233-2014380200018>.

MATOS, A M. F. *et al.* Identification by MALDI-TOF MS of *Sporothrix brasiliensis* Isolated from a Subconjunctival Infiltrative Lesion in an Immunocompetent Patient. **Microorganisms**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.22-22, 21 dez. 2019. MDPI AG

MIALSKI, R *et al.* Chronic Meningitis and Hydrocephalus due to *Sporothrix brasiliensis* in Immunocompetent Adults: a challenging entity. **Open Forum Infectious Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 1-1, 1 maio 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofy081>.

MOREIRA, JAS.; FREITAS, DFS.; LAMAS, CC. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. **Infection**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 267-276, 21 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-015-0746-1>.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis: **Clin Exp Dermatol**: v. 27, n. 6, p. 427-431, set./2002.

NASCIMENTO, RC. *et al.* Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 38, n. 11, p.3080-3089, nov. 2008. Wiley.

NUNES, G. D. L *et al.* Esporotricose felina no município de Itaporanga, Estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 157-161, jul./dez. 2011.

OLIVEIRA, LC *et al.* Diagnostic performance of mycologic and serologic methods in a cohort of patients with suspected sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 61-65, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2018.09.002>.

OLIVEIRA, MME *et al.* Sporotrichosis Caused By *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: Case Report. **Mycopathologia**, [s.l.], v. 169, n. 5, p.359-363, 4 fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-010-9276-7>

OLIVEIRA, MME *et al.* Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research In Microbiology**, [s.l.], v. 166, n. 2, p.102-110, fev. 2015. Elsevier BV.

OROFINO-COSTA, R *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 92, n. 5, p.606-620, out. 2017. FapUNIFESP (SciELO).

OYARCE, JA. *et al.* Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. **Revista Chilena de Infectología**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.315-321, jun. 2016.

PADHYE, AA *et al.* Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 2492-2494, 1992.

PAPPAS, P. G. *et al.* Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 65-70, 1 jan. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/313607>.

QUEIROZ-TELLES, F *et al.* Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.367-377, nov. 2017. Elsevier BV.

QUEIROZ-TELLES, F *et al.* Subcutaneous mycoses. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.59-85, mar. 2003. Elsevier BV

QUEIROZ-TELLES, F; BUCCHERI, R; BENARD, G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. **Journal Of Fungi**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.8-10, 11 jan. 2019. MDPI AG.

QUINTAL, D. Sporotrichosis Infection on Mines of the Witwatersrand. **Journal Of Cutaneous Medicine And Surgery**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 51-54, jan. 2000. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/120347540000400113>.

RIBEIRO, C.R. *et al.* Ocular Sporotrichosis. **American Journal Of Ophthalmology Case Reports**, [S.L.], v. 19, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoc.2020.100865>.

RIBEIRO, F. C. *et al.* Use of ELISA employing Leishmania (*Viannia*) braziliensis and Leishmania (*Leishmania*) chagasi antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 148, n. 3-4, p.200-206, set. 2007. Elsevier BV.

RODRIGUES A.M. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, [São Paulo], 12 fev. 2020.

RODRIGUES, A.M. *et al.* Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-10, jan. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2014.33>.

RODRIGUES, A.M. *et al.* Proteomics-Based Characterization of the Humoral Immune Response in Sporotrichosis: Toward Discovery of Potential Diagnostic and Vaccine

Antigens. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 8, 25 ago. 2015. Public Library of Science (PLoS)

RODRIGUES, A.M. *et al.* *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, [s.l.], v. 120, n. 2, p.246-264, fev. 2016. Elsevier BV

RODRIGUES, A.M. Taxonomia Polifásica E Características Proteômicas Do Complexo *Sporothrix Schenckii*. 2010. 265 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

RODRIGUES, A.M.; HOOG, G.S; CAMARGO, Z.P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.405-412, maio 2013. Oxford University Press (OUP).

RODRIGUES, A.M.; HOOG, G.S; CAMARGO, Z.P. Sporothrix Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 12, n. 7, p.1-5, 14 jul. 2016. Public Library of Science (PLoS).

RODRIGUES, M.L. *et al.* Extracellular Vesicles Produced by Cryptococcus neoformans Contain Protein Components Associated with Virulence. **Eukaryotic Cell**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.58-67, 26 nov. 2007. American Society for Microbiology.

RODRIGUES, M.L.; ALBUQUERQUE, P.C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 6, jun. 2018.

ROSSATO, L. ***Sporothrix brasiliensis***: aspectos imunológicos e de virulência. 2017. 138 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Farmácia, Fisiopatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/02/878456/luana_rossato_do_corrigida.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2020.

ROSSOW, J.A. *et al.* A One Health Approach to Combatting *Sporothrix brasiliensis*: narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in south america. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 247, 26 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6040247>

RUIZ-BACA, E *et al.* 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 106, n. 2, p.248-250, mar. 2011. FapUNIFESP (SciELO)

SASAKI, A.A. *et al.* Chromosomal Polymorphism in the *Sporothrix schenckii* Complex. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 1, 23 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086819>

SCHUBACH, A. *et al.* Primary Conjunctival Sporotrichosis. **Cornea**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.491-493, maio 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

SCHUBACH, A; BARROS, M.B.L; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.129-133, abr. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

SCHUBACH, T.M.P. *et al.* Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998–2003). **Medical Mycology**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.87-92, jan. 2006. Oxford University Press (OUP).

SOTO, M.C.R. *et al.* Sporotrichosis: The Story of an Endemic Region in Peru over 28 Years (1985 to 2012). **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.1-2, 1 jun. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127924>.

TIRADO-SÁNCHEZ, A; BONIFAZ, A. Nodular Lymphangitis (Sporotrichoid Lymphocutaneous Infections). Clues to Differential Diagnosis. **Journal Of Fungi**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.56, 9 maio 2018. MDPI AG

VÁSQUEZ-DEL-MERCADO, E *et al.* Sporotrichosis. **Clinics In Dermatology**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 437-443, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.09.017>.

WORDELL, Cindy J.. Use of Intravenous Immune Globulin Therapy: an overview. **Dicp**, [S.L.], v. 25, n. 7-8, p. 805-817, jul. 1991. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/106002809102500717>.

YU, X *et al.* Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia**, [S.L.], v. 176, n. 1-2, p. 67-74, 16 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-013-9668-6>.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R M. *et al.* Molecular Cloning, Characterization, and Expression of the M Antigen of *Histoplasma capsulatum*. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 1947-1953, 1 abr. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.67.4.1947-1953.1999>.

ZHANG, Z; HOU, B; XIN, Y; LIU, X. Protein Profiling of the Dimorphic Pathogenic Fungus, *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, [S.L.], v. 173, n. 1, p. 1-11, 13 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC.

ZHAO, M *et al.* Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal Of Zhejiang University-science B**, [s.l.], v. 16, n. 11, p.940-947, nov. 2015. Zhejiang University Press.

ZHOU, X *et al.* Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, [s.l.], 31 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC

APÊNDICE 1 – RESULTADOS DO TESTE LA-SPOROTHRIX GRUPO 1

Amostra	Resultado do teste	Forma clínica do paciente
1	Não Reagente	Articular
2	Não Reagente	Imunoalérgica
3	Não Reagente	Ocular
4	Não Reagente	Linfocutânea
5	Não Reagente	Ocular
6	1:8	Ocular
7	Não Reagente	Linfocutânea
8	1:32	Linfocutânea
9	Não Reagente	Linfocutânea
10	Não Reagente	Cutâneo fixa
11	Não Reagente	Linfocutânea
12	Não Reagente	Linfocutânea
13	Não Reagente	Linfocutânea
14	1:8	Linfocutânea
15	Não Reagente	Cutâneo fixa
16	Não Reagente	Linfocutânea
17	Não Reagente	Linfocutânea
18	Não Reagente	Linfocutânea
19	Não Reagente	Cutâneo fixa
20	1:8	Linfocutânea
21	1:32	Linfocutânea
22	Não Reagente	Linfocutânea
23	1:32	Ocular
24	Não Reagente	Linfocutânea
25	1:32	Linfocutânea
26	1:32	Cutâneo fixa
27	Não Reagente	Linfocutânea
28	Não Reagente	Linfocutânea
29	Não Reagente	Linfocutânea
30	1:32	Linfocutânea
31	Não Reagente	Cutâneo fixa
32	Não Reagente	Cutâneo fixa
33	1:32	Cutâneo fixa
34	Não Reagente	Linfocutânea
35	1:16	Linfocutânea
36	Não Reagente	Linfocutânea
37	1:16	Cutâneo fixa
38	1:64	Linfocutânea
39	Não Reagente	Linfocutânea
40	1:32	Linfocutânea
41	Não Reagente	Linfocutânea

(continua)

APÊNDICE 1 – RESULTADOS DO TESTE LA-*Sporothrix* grupo 1

(conclusão)

42	Não Reagente	Linfocutânea
43	1:16	Linfocutânea
44	Não Reagente	Cutâneo fixa
45	Não Reagente	Linfocutânea

APÊNDICE 2 – RESULTADOS DO TESTE LA-SPOROTHRIX GRUPO 2

Amostra	Resultado do teste	Patogenia associada
1	Não Reagente	Aspergilose Invasiva
2	Não Reagente	Aspergilose Pulmonar
3	Não Reagente	Aspergilose Pulmonar
4	Não Reagente	Aspergilose Pulmonar
5	Não Reagente	Candidemia
6	Não Reagente	Candidemia
7	Não Reagente	Candidemia
8	Não Reagente	Candidemia
9	1:2048	Candidemia
10	Não Reagente	Candidemia
11	Não Reagente	Candidemia
12	Não Reagente	Candidemia
13	Não Reagente	Candidemia disseminada
14	Não Reagente	Criptococose pulmonar
15	Não Reagente	Criptococose pulmonar
16	Não Reagente	Criptococose pulmonar
17	Não Reagente	Neurocriptococose
18	Não Reagente	Neurocriptococose
19	Não Reagente	Neurocriptococose
20	Não Reagente	Neurocriptococose
21	Não Reagente	Neurocriptococose
22	Não Reagente	Neurocriptococose
23	Não Reagente	Neurocriptococose
24	Não Reagente	Neurocriptococose
25	Não Reagente	Neurocriptococose
26	Não Reagente	Neurocriptococose
27	Não Reagente	Neurocriptococose
28	Não Reagente	Neurocriptococose
29	Não Reagente	Neurocriptococose
30	Não Reagente	Neurocriptococose
31	Não Reagente	Neurocriptococose
32	Não Reagente	Cromoblastomicose
33	Não Reagente	Fusariose Disseminada
34	Não Reagente	Histoplasmose
35	Não Reagente	Histoplasmose
36	Não Reagente	Histoplasmose
37	Não Reagente	Histoplasmose
38	Não Reagente	Histoplasmose
39	Não Reagente	Histoplasmose Africana
40	Não Reagente	Histoplasmose Disseminada
41	Não Reagente	Histoplasmose Disseminada

(continua)

APÊNDICE 2 – RESULTADOS DO TESTE LA-*SPOROTHRIX* GRUPO 2

(conclusão)

42	Não Reagente	Lobomicose
43	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
44	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
45	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
46	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
47	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
48	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
49	1:16	Paracoccidioidomicose
50	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
51	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
52	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
53	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
54	1:2048	Paracoccidioidomicose
55	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
56	Não Reagente	Paracoccidioidomicose
57	Não Reagente	Paracoccidioidomicose

APÊNDICE 3 – RESULTADOS DO TESTE LA-SPOROTHRIX GRUPO 3

Amostra	Resultado do teste
1	1:8
2	Não Reagente
3	Não Reagente
4	Não Reagente
5	Não Reagente
6	Não Reagente
7	Não Reagente
8	Não Reagente
9	Não Reagente
10	Não Reagente
11	Não Reagente
12	Não Reagente
13	Não Reagente
14	Não Reagente
15	Não Reagente
16	Não Reagente
17	Não Reagente
18	Não Reagente
19	Não Reagente
20	Não Reagente
21	Não Reagente
22	Não Reagente
23	Não Reagente
24	Não Reagente
25	Não Reagente
26	Não Reagente
27	Não Reagente
28	Não Reagente
29	Não Reagente
30	Não Reagente
31	Não Reagente
32	Não Reagente
33	Não Reagente
34	Não Reagente
35	Não Reagente
36	1:8
37	Não Reagente
38	Não Reagente
39	Não Reagente
40	Não Reagente

(continua)

APÊNDICE 3 – RESULTADOS DO TESTE LA-SPOROTHRIX GRUPO 3

(conclusão)

41	Não Reagente
42	Não Reagente
43	Não Reagente
44	Não Reagente
45	1:32
46	Não Reagente
47	Não Reagente
48	1:8
49	Não Reagente
50	Não Reagente
51	Não Reagente
52	Não Reagente

ANEXO 1 – BULA DE REALIZAÇÃO DO TESTE LA-*SPOROTHRIX*



LA-Coccidioides, LA-Histoplasma, and LA-Sporothrix Antibody Systems

REF CL1001, HL1001, SL1001, and Individual Reagents

IVD

INTENDED USE

The LA-*Coccidioides* (REF CL1001), LA-*Histoplasma* (REF HL1001), and LA-*Sporothrix* (REF SL 1001) antibody detection systems are semi-quantitative tests that detect agglutinating antibodies against *Coccidioides immitis* (*posadasii*), *Histoplasma capsulatum*, or *Sporothrix schenckii* in the serum of patients with coccidioidomycosis, histoplasmosis, or sporotrichosis, respectively, to aid in the diagnosis of disease.

EXPLANATION

Coccidioidomycosis

C. immitis (California isolates) and *C. posadasii* (non-California isolates) are somewhat localized in the southwestern United States (5) and Central and South America, but modern transportation has increased the likelihood of infection for individuals visiting the region. The LA-*Coccidioides* test is a sensitive and rapid screening test, but it has a false-positive rate, so confirmation of the results of latex agglutination (LA) by immunodiffusion (ID) and/or complement fixation (CF) is recommended (4).

Histoplasmosis

Histoplasmosis results from infection with *H. capsulatum*, which has a worldwide distribution, but is a particular problem in central and southeastern areas of the United States and in certain regions of Central and South America (16) The LA-*Histoplasma* test is useful for the presumptive early detection of acute histoplasmosis (12). A positive LA test result can be demonstrated as early as 2 to 3 weeks after infection with *H. capsulatum*; however confirmation of the LA test result by ID and/or CF is recommended (12).

Sporotrichosis

Sporotrichosis is an endemic fungal infection caused by *S. schenckii* with most case reports coming from the tropical and subtropical regions of the Americas (13). The LA-*Sporothrix* test is a sensitive, rapid test that is useful for the presumptive diagnosis of sporotrichosis from patients with localized cutaneous, subcutaneous, disseminated subcutaneous or systemic forms of the disease (9).

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The LA-*Coccidioides*, LA-*Histoplasma*, and LA-*Sporothrix* antibody systems are based upon the principle that *Coccidioides*, *Histoplasma*, or *Sporothrix* antigen-coated latex particles will agglutinate with specimens containing anti-*Coccidioides*, anti-*Histoplasma*, or anti-*Sporothrix* antibodies, respectively. The LA-tests detect agglutinating antibodies that are of sufficiently large size to bridge between antigen-coated latex particles (10). Immunoglobulins other than IgM (e.g. IgG, IgA, and IgD) are not as effective at bridging between the sensitized particles, and therefore positive reactions by LA are mostly associated with IgM antibodies. (10).

MATERIALS PROVIDED

LA-*Coccidioides* Antibody System

- Coccidioides Latex** (4 ml, REF CX0000): Contains a standardized suspension of *Coccidioides* antigen-coated latex particles and a preservative.
- Coccidioides Latex Positive Control** (1 ml, REF CE0000): Contains serum from goats immunized with *C. immitis* antigens and a preservative.
- Negative Control** (1 ml, REF N80110): Normal goat serum containing a preservative.
- Disposable Ring Slides** (REF SC0020)

LA-*Histoplasma* Antibody System

- Specimen Diluent** (10 ml, REF GB0020): Concentrated (10X) glycine buffered saline (pH 8.6) containing albumin and a preservative.
- Histoplasma Latex** (4 ml, REF HB0000): Contains a standardized suspension of *Histoplasma* antigen-coated latex particles and a preservative.
- Histoplasma Latex Positive Control** (1 ml, REF HC0000): Contains serum from goats immunized with *H. capsulatum* antigens and a preservative.
- Negative Control** (1 ml, REF N80110): Normal goat serum containing a preservative.
- Disposable Ring Slides** (REF SC0020)

LA-*Sporothrix* Antibody Detection System

- Specimen Diluent** (10 ml, REF GB0020): Concentrated (10X) glycine buffered saline (pH 8.6) containing albumin and a preservative.
- Sporothrix Latex** (4 ml, REF SX0000): Contains a standardized suspension of *Sporothrix* antigen-coated latex particles and a preservative.
- Sporothrix Latex Positive Control** (1 ml, REF S20000): Contains lyophilized serum from rabbits immunized with *S. schenckii* antigens and a preservative.
- Negative Control** (1 ml, REF N80110): Normal goat serum containing a preservative.
- Disposable Ring Slides** (REF SC0020)

MATERIALS NOT PROVIDED

- Distilled or DI water
- 1-ml serological pipettes
- Disposable borosilicate glass test tubes (non-silicized), 10 or 12 X 75 mm, for specimen dilutions
- Test tube rack
- Water bath or heat block (56° C)
- Wooden applicator sticks
- Rotator set to 100 rpm
- Timer
- Pipettor (25 µL and 100 µL)

PRECAUTIONS

- All reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only!
- Specific standardization is necessary to produce our high quality reagents and materials. IMMY cannot guarantee the performance of its products when used with materials purchased from other manufacturers.
- Do not use reagents containing foreign matter, particulates or aggregates, which indicate contamination or improper storage or handling.
- Specimens must not contain bacteria, visible lipids, or other obvious signs of contamination.
- Do not store specimens in a frost-free freezer. Repeated freezing and thawing of the specimens can affect test results.
- When handling patient specimens, adequate measures should be taken to prevent exposure to etiologic agents potentially present in the specimen.
- All reagents are preserved with sodium azide [0.095% (w/w)], which is a skin irritant. It is recommended that excess reagents be discarded in an appropriate waste receptacle.

STABILITY AND STORAGE

All reagents should be stored at 2-8° C, and are stable until the expiration date. Prolonged periods at room temperature should be avoided. Avoid **FREEZING** latex suspensions, as this causes granularity, which might be interpreted as a false positive reaction.

REAGENT PREPARATION

- Specimen diluent (REF GB0020) should be diluted 1:10 with distilled or DI water prior to use.
- Latex positive controls (REF CE0000, HC0000, and S20000) are rehydrated by adding 1 ml of distilled or DI water to the vial and incubating at room temperature until completely dissolved followed by gentle mixing.
- When using the latex positive controls (REF CE0000, HC0000, and S20000) and negative control (REF N80110) for the first time, heat inactivate at 56° C for 30 minutes.
- Latex suspensions (REF CX0000, HB0000, and SX0000) must appear as homogeneous suspensions – MIX WELL prior to each use!
- The ring slides (REF SC0020) should be discarded after each use.

SPECIMEN PREPARATION

- Collect whole blood aseptically following accepted procedures. The specimen must not contain anticoagulants as this will invalidate the test.
- Permit blood to clot for 10 minutes or more at room temperature in a collection tube.
- Centrifuge 1000 x g for 15 minutes.
- Carefully aspirate the serum into a sterile container and seal.
- Specimen may be processed immediately, refrigerated, preserved by freezing at -20° C, or by adding thimerosal to provide a final concentration of 0.01%.
- Incubate specimen at 56° C for 30 minutes.

COMPLETE THE FOLLOWING STEPS FOR LA-HISTOPLASMA and LA-SPOROTHRIX ONLY Complete the following dilutions for LA-Histoplasma and LA-Sporothrix ONLY

- Add 100 µl of specimen diluent (REF GB0020) to each of 6 tubes labeled 1-6, and place in a rack (1:2 through 1:64 dilutions). Additional dilutions may be necessary if the specimen is positive at 1:64.
- Add 100 µl of patient specimen to tube #1 and mix well.
- Transfer 100 µl from tube #1 to tube #2 and mix well. Continue this dilution procedure through tube #6.
- Specimen dilutions are ready for testing (see PROCEDURE).

NOTE: Diluted specimens are **NOT** recommended for LA-*Coccidioides* (11, 12).

PROCEDURE

- Add 25 µl of latex positive control (REF CE0000, HC0000, or S20000), negative control (REF N80110), and each specimen dilution (or undiluted specimen for LA-*Coccidioides*) onto separate rings of the ring slide.
- Add one (1) drop of *Coccidioides*, *Histoplasma*, or *Sporothrix* latex (REF CX0000, HB0000, SX0000, respectively) onto each ring.

- C. Using separate applicator sticks, thoroughly mix the contents of each ring.
- D. Rotate by hand or place the ring slide on a rotator set to 100 rpm (+/-25) for 10 minutes at room temperature.
- E. Read the reactions immediately (see **Reading the Test**).

Reading the Test

Read the reactions immediately over a dark background, and rate them on a scale from negative to 4+. Do not magnify. For comparison, the latex positive control should give a 2+ or greater reaction, and the negative control should be less than 1+ reaction. The gradations of the reaction strengths are as follows:

- Negative (-):** A homogeneous suspension of particles with no visible clumping.
- One Plus (1+):** Fine granulation against a milky background.
- Two Plus (2+):** Small but definite clumps against a slightly cloudy background.
- Three Plus (3+):** Large and small clumps against a clear background.
- Four Plus (4+):** Large clumps against a very clear background.

QUALITY CONTROL

Latex Control

Periodically, the sensitivity of the latex reagent (REF CX0000, HB0000, SX0000) may be tested by titering their respective positive controls (REF CE0000, HC0000, S20000). The positive control should be 2+ at 1:4 ±1 dilutions if the sensitivity of the latex reagents is satisfactory.

INTERPRETATIONS OF RESULTS

Control Reactions

The latex positive control must be 2+ or greater and the negative control must be less than 1+. If either control is incorrect one or both of the reagents is unsatisfactory (or the tests were performed improperly) and any patient tests with the reagents are invalid. A positive reaction with the negative control may indicate possible contamination or freezing of the latex, which could produce false positive results in patient specimens.

Patient Specimens

- A. Coccidioidomycosis: A positive LA reaction with undiluted sera should be confirmed by ID or CF testing (12). A 2+ or greater reaction is considered a positive result.
- B. Histoplasmosis: LA test titers of 1:16 or greater are considered presumptive evidence of active or very recent infection by *H. capsulatum* (12). The titer is the highest serum dilution that gives a 2+ agglutination (12).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Coccidioidomycosis

False positives can occur, so confirmation of the results by immunodiffusion (ID) and/or complement fixation (CF) is recommended (4). False negative reactions may occur in immunocompromised or immunosuppressed patients (1-3). No single test is adequate for detecting all positive specimens from cases of coccidioidomycosis (7, 15).

Histoplasmosis

Cross reactions with other systemic mycoses may occur with the LA test (12). Results should be interpreted with caution, particularly if only one specimen has been examined and the titer is low (12). The test should be repeated after 1 to 3 months (12). Additionally, confirmation of the LA test result by ID and/or CF is recommended (12). False negative reactions may occur in immunocompromised or immunosuppressed patients or persons with chronic histoplasmosis (12). Agglutinating antibodies to *H. capsulatum* antigens may be significantly increased in histoplasmin skin testing (12).

Sporotrichosis

False positive reactions have been noted at titers of 1:8 with sera from patients with non-fungal infections (12).

EXPECTED VALUES AND SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Coccidioidomycosis

The LA test is not as specific as the immunodiffusion IDTP test; at least 6% false positive reactions may occur with the LA test (7, 9). The LA and ID tests performed simultaneously detected 93% of the coccidioidomycosis cases (8). The LA test has a sensitivity and specificity of 66% and 93%, respectively (7).

Histoplasmosis

A positive LA test result can be demonstrated as early as 2 to 3 weeks after infection with *H. capsulatum*; therefore the LA test is an excellent presumptive test that aids in the diagnosis of acute histoplasmosis (12). The LA test has sensitivity of 100% and 46% for

acute primary pulmonary and chronic pulmonary infections, respectively, and an overall sensitivity of 62% (6). The specificity of the LA test is 97% (6).









Sporotrichosis

Sera from patients with localized cutaneous lymphocutaneous or extracutaneous sporotrichosis may show titers that range from 1:8 to 1:512 (12). An increasing titer or a sustained high titer is helpful in the diagnosis of pulmonary sporotrichosis (12). The LA test has limited prognostic value (12). The LA test has a sensitivity of 100%, 86%, 73%, and 56% for disseminated, articular, pulmonary, and cutaneous disease, respectively (14). The specificity of the LA test is 100% (14).

REFERENCE LIST

1. Abrams, D.J., M.Robia, W. Blumenfeld, J. Simonson, M. B. Cohen, and W.K. Hadley. 1984. Disseminated coccidioidomycosis in AIDS. N.Engl.J.Med. 310:986-987.
2. Antoniskis, D., R. A. Larsen, B. Akil, M.U. Rarick, and J.M. Leedom. 1990. Seronegative disseminated coccidioidomycosis in patients with HIV infections. AIDS 4:691-693.
3. Bronniman, D.A., Adam, J.N., Galgiani, M.P. Habib, E.A. Petersen, B.Porter, and J.W. Bloom. 1987. Coccidioidomycosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann.Intern.Med. 106:371-379.
4. Drutz, D.J. and A. Cantanzaro. 1978. Coccidioidomycosis. Part I Am.Rev.Respir.Dis. 117:559-585.
5. Fisher, M.C., B. Rannala, V. Chaturvedi, and J.W. Taylor. 2002. Disease surveillance in recombining pathogens: multilocus genotypes identify sources of human Coccidioides infections. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 99:9067-6071.
6. Hill, G.B. and C.C. Campbell. 1962. Commercially available histoplasmin sensitized latex particles in an agglutination test for histoplasmosis. Mycopathologia 18:169-176.
7. Huppert, M., E.T. Peterson, S.H. Sun, P.A. Chitjian, and W.J. Derrevere. 1968. Evaluation of a latex particle agglutination test for coccidioidomycosis. Amer.J.Clin.Path. 49:96-102.
8. Kaufman, L., J.A. Kovac and E. Reiss. 1997. Clinical Immunomyology, p.575-583. In N. Rose, E. de Macario, J. Folds, H. Lane and R. Nakamura (eds.) Manual of clinical laboratory immunology. American Society for Microbiology, Washington D.C.
9. Martins, T.B., T.D. Jaskowski, C.L. Mouritsen and H.R. Hill. 1995. Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to Coccidioides immitis. J.Clin.Microbiol. 33:940-943.
10. Pappagianis, D. and B.L. Zimmer. 1990. Serology of coccidioidomycosis. Clin.Microbiol.Rev.3:247-268.
11. Reiss, E., L. Kaufman, J. Kovacs and M. Lindsay. 2002. Clinical Immunomyology, p.559-583. In N. Rose, R. Hamilton, and B. Detrick (eds.) Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM Press, Washington D.C.
12. Rex, J.H. and P.C. Okhuysen. 2000. Sporothrix schenckii, (eds.) Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia.
13. Roberts, G.D. and H.W. Larsh. 1971. The serologic diagnosis of extracutaneous sporotrichosis.
14. Wallraff, E.B. and E.E. Wachs. 1969. Recent development in serologic methods for the diagnosis of coccidioidomycosis. Amer.J.Clin.Path. 51:366-369.
15. Wheat, J. 1995. Endemic mycoses in AIDS: A clinical review. Clin.Microbiol.Rev. 8:146-159.

INTERNATIONAL SYMBOL OF USAGE

	Storage 2-8 °C		Lot Number
	Manufactured by		Reference Number
	Expiration Date		In Vitro Diagnostics
	Conforms to European Union Requirements		Sufficient for "# Tests



EC REP

MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany



IMMY, Inc.
2701 Corporate Centre Dr
Norman, OK 73069 U.S.A.
(405) 360.4669/800.654.3639
FAX: (405) 364.1058
E-MAIL: info@immy.com
WEB: www.immy.com

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Alisson Cuch de Mattos, aluno de pós-graduação da Universidade Federal do Paraná, juntamente com o Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles Filho (médico infectologista do Complexo Hospital de Clínicas e pesquisador responsável pelo trabalho), o Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues (pesquisador do Instituto Carlos Chagas) e a Msc. Regielly Caroline Raimundo Cognialli (Farmacêutica-Bioquímica do Setor de Micologia do CHC-UFPR) convidamos o(a) Senhor(a) a participar do estudo intitulado “*Avaliação da Sensibilidade e Especificidade de um Método Sorológico no diagnóstico da Esporotricose e realização de um Levantamento Epidemiológico da doença*”, que se justifica em validar um meio de diagnóstico rápido e preciso da doença bem como levantar dados e realizar a comparação sobre evolução da doença e as manifestações clínicas em diferentes pacientes.

- O objetivo dessa pesquisa é analisar os aspectos epidemiológicos e diagnósticos dos pacientes com Esporotricose atendidos no CHC- UFPR no período de 2000-2018 e avaliar a possibilidade do uso de um teste rápido para o diagnóstico da doença para que a mesma seja diagnosticada e tratada o mais rápido possível.
- Caso o(a) Sr(a) participe da pesquisa, sua amostra será condicionada no grupo Teste, sendo positivo para Esporotricose ou outras micoses sistêmicas. O material, quando disponível, poderá ser resgatado dos exames de rotina solicitados pelo médico. Caso contrário será necessária à coleta de sangue a qual será realizada no Setor de Coleta de Materiais Biológicos situada na Rua Padre Camargo, 290 Alto da Glória – Curitiba, Pr.
- Não existe nenhum risco grave relacionado a participação, o máximo é que o(a) Senhor(a) experimente algum desconforto, relacionado à coleta de sangue e/ou ocorra quebra do sigilo de sua identidade, porém os pesquisadores tomaram providências para evitar esse risco.
- Os benefícios esperados com essa pesquisa é a validação de uma forma de diagnóstico rápido da doença bem como uma forma alternativa de acompanhamento do tratamento.
- O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles Filho, poderá ser localizado na Rua General Carneiro nº181 no SAM 1 as terças-feiras no período das 08:00 às 10:00hrs ou ainda pelo email queiroz.telles@uol.com.br; O pesquisador Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues poderá ser contatado pelo email marcio.rodrigues@fiocruz.br; A pesquisadora Msc. Regielly Caroline Raimundo Cognialli poderá ser contatada pelo email

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

regielly.cogniali@gmail.com e o pesquisador Alisson Cuch de Mattos poderá ser contatado na rua Padre Camargo, nº 280 - Alto da Glória, Curitiba, no setor de coleta ou ainda no laboratório de análises clínicas no setor de micologia; pelo e-mail allyson.mattos17@gmail.com ou pelo telefone 41 3360-7834, no horário comercial (08:00hrs – 17:00hrs) para esclarecer eventuais dúvidas que o(a) senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

- Se o(a) Senhor(a) tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041 das 08:00 horas as 14:00 horas de segunda a sexta-feira. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.
- A sua participação neste estudo é voluntária e se o(a) senhor(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.
- As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas como o médico Infectologista Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho, pelo Dr. Márcio Lourenço Rodrigues, pesquisador do Instituto Carlos Chagas ou ainda pela Msc. Regielly Caroline Raimundo Cogniali, farmacêutica-bioquímica do CHC-UFPR. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade.
- A amostra biológica obtida será utilizada unicamente para essa pesquisa e será descartada ao término do estudo, dentro de 11 meses.
- As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e o(a) senhor(a) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.
- Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Eu, _____
li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo

Nome completo, legível do Participante e/ou Responsável Legal

Assinatura do Participante e/ou Responsável Legal

Nome completo do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

(SOMENTE PARA O RESPONSÁVEL DO PROJETO)

Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou seu representante legal para a participação neste estudo.

Nome completo do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Assinatura do Pesquisador e/ou quem aplicou o TCLE

Curitiba, ____ de _____ de 2019.

Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____
