
Resumo

Otimização e validação da metodologia de ELISA indireto para o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose causada por *Paracoccidioides brasiliensis*

Luciane Regina Franciscone Silva; Adriana Pardini Vicentini (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil, 2014

RESUMO

O diagnóstico de certeza de processos infecciosos como na paracoccidioidomicose (PCM) deriva da demonstração e do reconhecimento do agente etiológico em preparados histológicos, exame direto ou em cultivo. No entanto, em algumas situações, a pesquisa de anticorpos e antígenos específicos circulantes no soro de pacientes assume grande importância no diagnóstico indireto da infecção. Historicamente, na PCM, a sorologia, além de importante auxílio diagnóstico, tem a função de monitorar o curso da doença durante e após o tratamento através do acompanhamento dos títulos de anticorpos antifúngicos específicos. O Manual da Vigilância da Paracoccidioidomicose do Estado de São Paulo preconiza, para o imunodiagnóstico de pacientes com suspeita clínica desta patologia, a utilização do teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) como triagem. Apesar desta recomendação, esta realidade não é observada na prática laboratorial, a técnica frequentemente utilizada é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID). O teste de ELISA tem sido utilizado para a detecção de anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas, senão em todas. Em relação ao imunodiagnóstico da PCM, a técnica de ELISA oferece ainda porcentagens de reatividade cruzada, porém, por ser um ensaio mais rápido, sua utilização como teste de triagem é de grande valia. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar a metodologia de ELISA indireto para uso como método de triagem dos soros com suspeita clínica para PCM. A concentração proteica de antígeno para a sensibilização das placas foi de 10,0µg/poço e as diluições de soro e conjugado foram de 1:100 e 1:3.000, respectivamente. O antígeno de escolha foi o filtrado de cultura de *P. brasiliensis* do isolado B-339. Para a validação da técnica foram utilizadas 166 amostras do grupo controle, sendo elas 111 de pacientes aparentemente sadios e 55 de pacientes com PCM confirmada. Para avaliar o desempenho da técnica, foram utilizadas 205 amostras de pacientes com suspeita clínica para PCM. A análise dos resultados do grupo controle demonstrou sensibilidade de 67% e 96% e especificidade de 100% e 95% para a ID e ELISA indireto, respectivamente. A comparação das duas técnicas, sendo ID padrão ouro, resultou em co-positividade de 100% e co-negatividade de 70%. A concordância entre as técnicas foi classificada como boa, segundo índice kappa. A análise das amostras de soros de pacientes com outras doenças pulmonares (aspergilose, histoplasmose e tuberculose) demonstrou 50% de reação cruzada. Os resultados demonstram que, a metodologia de ELISA indireto, devido sua alta sensibilidade, pode ser aplicada como teste de triagem sorológica; conferindo assim maior rapidez na liberação dos laudos de pacientes com ausência de reatividade para *P. brasiliensis*.

PALAVRAS-CHAVE: Paracoccidioidomicose. *Paracoccidioides brasiliensis*. Imunodiagnóstico. Imunodifusão Dupla. ELISA.

Abstract

Optimization and validation methodology of indirect ELISA for the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*

Luciane Regina Franciscone Silva; Adriana Pardini Vicentini (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil, 2014

ABSTRACT

The definitive diagnosis of infectious processes as in paracoccidioidomycosis (PCM) derives from the demonstration and recognition of the etiologic agent in histological preparations, direct examination or culture. However, in some situations, the search for circulating antigens and specific antibodies in the serum of patients is of great importance in the indirect diagnosis of infection. Historically, the PCM, serology, and an important diagnostic aid, has the function of monitoring the course of disease during and after treatment through monitoring of titers of specific antibodies antifungal. The Manual of Surveillance Paracoccidioidomycosis from the State of São Paulo advocates for immunodiagnosis of patients with clinical suspicion of this pathology, the use of ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) as screening. Despite this recommendation, this reality is not observed in laboratory practice, the commonly used technique is the double immunodiffusion in agarose gel (ID). The ELISA method has been used to detect antibodies in nearly all systemic mycoses, if not all. Regarding the immunodiagnosis of PCM, the ELISA technique also provides percentages of cross-reactivity, however, because it is a faster test, its use as a screening test is of great value. Accordingly, the aim of this work was to optimize and validate the methodology of indirect ELISA for use as a screening of sera with clinical suspicion for PCM. The protein antigen concentration for sensitization of the plates was 10.0 mg/well and the dilutions of serum and conjugate were 1:100 and 1:3,000, respectively. The antigen of choice was filtered culture isolate of *P. brasiliensis* B-339. 166 samples from the control group were used for the validation of the technique, they are 111 apparently healthy patients and 55 patients with PCM confirmed. To evaluate the performance of the technique, 205 samples of patients suspected to PCM were used. The results of the control group demonstrated 67% sensitivity and 96% and specificity of 100% and 95% for ID and indirect ELISA, respectively. The comparison of the two techniques, and ID gold standard resulted in co-positivity 100% and co-negativity of 70%. The agreement between the techniques was rated as good, according to kappa index. The analysis of serum samples from patients with other lung diseases (aspergillosis, histoplasmosis and tuberculosis) showed a 50% cross-reactivity. The results show that the methodology of indirect ELISA, due to its high sensitivity, can be used as serological screening test; there by giving more speed in the release of reports of patients with absence of reactivity to *P. brasiliensis*.

KEYWORDS: Paracoccidioidomycosis. *Paracoccidioides brasiliensis*. Immunodiagnostic. Double Immunodiffusion. ELISA.