
Resumo

Padronização da metodologia de Dot-Blot para o diagnóstico rápido da Paracoccidioidomicose

Camila Mika Kamikawa; 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

A paracoccidioidomicose (PCM), micose profunda de natureza crônica granulomatosa, apresenta maior incidência no Brasil. O diagnóstico de certeza deriva da visualização do agente etiológico, o fungo *Paracoccidioides* spp em amostras biológicas. No entanto, em algumas situações o acesso ao local da lesão impede a coleta do material biológico. Assim, as técnicas imunoserológicas permitem inferir diagnóstico com certo grau de certeza, otimizando o tempo utilizado para se obter resultados. A técnica sorológica amplamente utilizada para o imunodiagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), com especificidade e sensibilidade variando de 65 a 100%; sendo de fácil execução e não necessitando de automação. A técnica de Dot-Blot (DB) tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de inúmeras doenças parasitárias e infecciosas, como a toxoplasmose e a leishmaniose visceral. No diagnóstico da PCM, a metodologia mostrou-se promissora no acompanhamento de pacientes durante o tratamento anti-fúngico e em inquéritos soropidemiológicos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi padronizar o ensaio de Dot-Blot visando o diagnóstico rápido da PCM, propondo que o mesmo seja uma ferramenta de triagem dos soros com suspeita clínica para a doença. A padronização da técnica de Dot-Blot apresentou melhores resultados quando se utilizou antígeno obtido de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* do isolado B-339 para a sensibilização de membranas de nitrocelulose. As diluições de soro e conjugado foram de 1:40 e 1:2000, respectivamente, incubando ambos em solução PBS-L 3%. Para a padronização do ensaio de Dot-Blot, 143 amostras de soro foram utilizadas e chamadas de grupo controle. Destas, 23 amostras de soro foram de pacientes aparentemente saudáveis, 77 amostras de soro de pacientes com PCM confirmada e 43 amostras de soros com outras doenças (tuberculose, aspergilose e histoplasmose). A análise dos resultados possibilitou o cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, prevalência e acurácia para ambas as técnicas isoladamente, sendo eles: 98,2%, 75,5%, 72,7%, 98,4%, 40% e 84,6% para a ID e 95,9%, 90%, 91%, 95,4%, 51% e 93% para DB, respectivamente. Além do grupo controle, mais 300 amostras de soro de pacientes apenas com a suspeita clínica da doença foram utilizadas para avaliar o desempenho da técnica padronizada. A pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* empregando-se o ensaio de imunodifusão dupla, revelou que 34% apresentaram reatividade e 66% ausência de reatividade para *P. brasiliensis*. Por outro lado, através da metodologia padronizada de Dot-blot observou-se o reconhecimento de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* em 47,3% e ausência de reatividade em 52,7%. Comparando a capacidade discriminatória de ambas as metodologias, pode-se sugerir que o DB apresenta uma tendência de elevar o padrão de reatividade, uma vez que reconheceu 40 (13,3%) soros a mais que a ID. Ao comparar os resultados dos dois testes, considerando a ID o teste padrão ouro, foram observados valores de copositividade e co-negatividade de 68,3% e 96,8%, respectivamente. E obtendo um índice de concordância entre elas de $\kappa=0,66$, classificada como boa. A análise da estabilidade das membranas de nitrocelulose dotadas com o antígeno de *P. brasiliensis* demonstrou que membranas armazenadas bloqueadas, independentemente da temperatura de armazenamento, não apresentaram padrão de reatividade como o observado em membranas armazenadas não bloqueadas. Melhores resultados e padrão de reatividade foram visualizados em membranas dotadas e armazenadas à temperatura ambiente, por até 90 dias. A repetitividade intermediária também apresentou resultados satisfatórios, já que apenas três amostras de soro, das 11 escolhidas aleatoriamente para o estudo, obtiveram resultados diferentes entre os quatro analistas distintos que realizaram a técnica de Dot-blot. Os resultados obtidos, além de demonstrarem que a técnica é de fácil execução, menor custo e tempo para a liberação de seu resultado, nos permite sugerir um novo algoritmo para o diagnóstico sorológico da PCM, substituindo a metodologia de ELISA indireto proposta para a realização da triagem sorológica pelo ensaio de Dot-Blot.

PALAVRAS-CHAVE: Testes imunológicos. Paracoccidioidomicose. Dot-Immunobinding. Dot-Elisa. Estudos de validação.

Metodology standardization of Dot-Blot for screening of paracoccidioidomycosis

Camila Mika Kamikawa; 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 paracoccidioidomycosis (PCM) is the greatest mycosis of chronic granulomatous nature in Brazil. The definitive diagnosis derives from the view of the etiologic agent, *Paracoccidioides* spp in biological samples. However, in some situations, access to the site of injury prevents the collection of biological material. Thus, immuno- serological techniques allow inferring diagnosis with a degree of certainty and optimizing time taken to get results. The serological technique widely used for immunodiagnosis of PCM is double immunodiffusion in agarose gel (DI), with a sensitivity and specificity ranging from 65 to 100%, being easy to perform and not requiring automation. The Dot-blot (DB) technique has been used successfully in the diagnosis of many infectious and parasitic diseases such as visceral leishmaniasis and toxoplasmosis. On the diagnosis of PCM, this methodology showed promise results in monitoring patients during treatment with anti-fungal and seroepidemiological surveys. Given the above, the objective of this study was to standardize the Dot-blot assay targeting the rapid diagnosis of PCM, suggesting that it is a screening tool for sera with clinical suspicion for the disease. The standardization of Dot-Blot showed better results when using antigen obtained from culture filtrate of *P. brasiliensis* isolated from B-339 to sensitize nitrocellulose membranes. The serum and conjugated dilutions were 1:40 and 1:2000, respectively, both incubating in PBS-3% L. For the standardization of the Dot-blot assay, 143 serum samples were used and called, control group. Of these, 23 samples were apparently healthy patients, 77 serum samples from patients with confirmed PCM and 43 serum samples with other diseases (tuberculosis and aspergillosis, histoplasmosis). The results enabled the calculation of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy prevalence for both techniques in isolation, as follows: 98.2%, 75.5%, 72.7%, 98.4%, 40% and 84.6% for DI and 95.9%, 90%, 91%, 95.4%, 51% and 93% for DB, respectively. In addition to the control group, 300 serum samples from patients with clinical suspicion of PCM were used to evaluate the performance of the standard technique. The circulating antibodies anti-*P. brasiliensis* employing double immunodiffusion, revealed that 34% were reactive and 66 % no reactivity to *P. brasiliensis*. On the other hand, by Dot-blot methodology, it was observed the serum recognition of anti-*P. brasiliensis* in 47.3% and no reaction in 52.7%. Comparing the discriminatory ability of both methods, it can be suggested that the DB has a tendency to raise the reactivity pattern, as recognized 40 sera higher than the DI. When comparing the results of the two tests, considering the DI the gold standard, it showed co-positivity and co-negativity of 68.3% and 96.8%, respectively. And getting an index of agreement between them for $\kappa=0.66$, rated as good. The analysis of the stability of nitrocellulose membranes dotted with the antigen of *P. brasiliensis* demonstrated that stored membranes blocked, regardless of the storage temperature showed no reactivity patterns as observed in membranes stored not blocked. Best results and reactivity patterns were seen in membrane fitted and stored at room temperature, up to 90 days. The intermediate repeatability also showed satisfactory results, since only three serum samples from 11 randomly selected for the study, were different among the four distinct analysts who performed the Dot-blot technique. The results obtained, demonstrate that the technique is easy to perform, less cost and time to its result, allowing us to suggest a new algorithm for the serological diagnosis of PCM, replacing the indirect ELISA methodology proposed for the realization of serological screening by Dot-blot assay.

KEYWORDS: Immunological tests. Paracoccidioidomycosis. Dot-Immunobinding. Dot-Elisa. Validation studies.