



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES

PARÂMETROS DE ANTÍGENOS PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Recife

2007

OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES

**PARÂMETROS DE ANTÍGENOS PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lusinete Aciole de Queiroz

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Mendes Giannini

Recife

2007

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Magalhães, Olliane Maria Correia

Parâmetros de antígenos para imunodiagnóstico da paracoccidioimicose. / Recife: O Autor, 2007.

87 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Lusinete Aciole de Queiroz

Coorientadora: Maria José Mendes Giannini

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2007.

Inclui referências e anexos

- 1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Antígenos 3. Testes imunológicos I. Queiroz, Lusinete Aciole de (orient.) II. Título**

571.995

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 474

OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES

**PARÂMETROS DE ANTÍGENOS PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Aprovada em: 28/09/2007

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz/UFPE

Profa. Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti/UFPE

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves/UFPE

Profa. Dra. Elizabethe Malagueño/UFPE

Profa. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho/UFPE

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira/UFPE – Suplente interno

Profa. Dra. Rosa Maria Carneiro /UFPE – Suplente externo

Dedico

Aos meus Pais

Na vida há vários mistérios e um deles é o tempo.

Tempo da saudade e da distância.

Tempo de lembrar e recordar.

Neste momento, não há como não lembrar daqueles que mesmo distante são merecedores
nesta vitória.

Ofereço

A Deus

Que confiamos nossas angústias e sofrimentos,
nossas alegrias e gratidão de sermos chamados
de teus filhos.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela força nos momentos difíceis de cansaço e pela satisfação durante as conquistas.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela contribuição durante toda minha caminhada acadêmica.

À Coordenação da pós-graduação em Biologia de Fungos, pelo apoio científico.

À minha querida orientadora e amiga particular Lusinete Aciole de Queiroz, pelo profissionalismo, compreensão e sabedoria.

À minha co-orientadora, Dra. Maria José Mendes-Giannini, pelos ensinamentos e compreensão.

Aos professores da Pós-graduação em Biologia de Fungos, pelos ensinamentos e contribuições valiosas.

À Dra. Maria José Mendes-Giannini, Dr. Julio Sidrim e Dra. Rossana Aguiar pelos soros fornecidos.

A Conceição, pela valiosa colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos meus alunos e amigos do Departamento de Micologia, em especial Polyanna, Suellen, Fabíola, Elvis, Gilmara, Reginaldo, Idalina, André, Patrícia, Alexandre, Flávia, Ana Maria, Carol, Heloísa, Kaline, Roberta, Dani, Helton, Helton Bill, Vanessa, Aline, Ana Beatriz, Edvânia, Bruno, Hanilda, Odacir, Ferrugem, Paula, Thaisa, entre tantos outros alunos queridos.

Aos meus amigos do Departamento de Micologia, Eliane, Maria de Lourdes, Gil, Rubem, Ângela, Laura, Silvia, Sidney, Marilene com quem sempre pude contar.

Aos amigos de turma do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (Nível Doutorado) pelos momentos que passamos juntos.

À amigas Maria José, Débora Lima, Elza Lima, Neiva Tinti, Maria Auxiliadora, Armando Marsden por todos os momentos de amizade que vivemos.

À minhas amigas-irmãs ou irmãs-amigas, Cris-Reja, que pelo simples fato de terem cruzado o meu caminho, me deixam feliz.

Quando sentires um vazio na alma, quando acreditares que ainda esta faltando algo, mesmo tendo tudo, remete teu pensamento para teus desejos mais íntimos e busque a divindade que existe em você.

Aristóteles

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) apresenta múltiplas manifestações clínicas é causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. PCM é diagnosticada pela detecção microscópica de células leveduriformes multibrotantes em amostras clínicas, pela cultura cotonosa e/ou cerebriforme e testes sorológicos. Os objetivos desta pesquisa foram padronizar antígenos de *P. brasiliensis* de cultura selvagem e de culturas obtidas na Coleção de Culturas Micoteca URM. As estruturas leveduriformes multibrotantes evidenciadas a partir da termoconversão demonstraram que as referidas culturas depositadas na Micoteca URM são compatíveis às descritas de *P. brasiliensis*, contudo algumas culturas apresentaram características morfológicas atípicas e perda da habilidade dimórfica. Os critérios adotados para seleção das culturas para obtenção de antígenos foram baseados nos aspectos macroscópicos das colônias e da termoconversão das células de *P. brasiliensis*, os quais permitiram selecionar as culturas URM 3634, 3635 e a cultura selvagem 5378. Com NGTA os antígenos produzidos foram padronizados pela titulação, concentração de proteínas e identificação de frações protéicas. O título dos antígenos foi 1/4, 1/8 e 1/32 e a concentração de proteínas 541µg/mL, 658µg/mL e 808µg/mL respectivamente das culturas URM 3634, 3635 e 5378. Os exoantígenos apresentaram várias frações protéicas. Com soros adquiridos de bancos de soros, foram realizados testes sorológicos com as técnicas de imunodifusão (ID), contraímuno eletroforese (CIE) e imunoblotting (IB). Com o teste de ID, os soros apresentaram 86,0% de sensibilidade, com CIE 98,0%. Com IB 100% de 29 soros testados reconheceram a molécula de 43 KDa, gp43, considerada o principal antígeno usado no imunodiagnóstico da PCM. Todos os testes expressaram 100% de especificidade.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Termoconversão. Antígenos. Sorodiagnóstico.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) presents multiples clinical manifestations being caused by thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. PCM is diagnosed by detection microscopic of yeast cells that reproduces by multiple budding in clinical samples, by culture cottony and/or cerebriform and by serological tests. The aims of research were to standard antigens of *P. brasiliensis* wild strain and strain obtained at the Coleção de Culturas - Micoteca URM. Like-yeast structures multiple-budding in thermoconversion ensured that the strains deposited at the Micoteca URM are *P. brasiliensis*; however some strains showed atypical morphological patterns and loss for dimorphic ability. The adopted criterion from selection of the fungi strains aiming at antigen production were based in observation macroscopic of the colonies and of the cells thermoconversion from *P. brasiliensis*, wich it allowed to select the strains URM 3634, 3635 and the wild strain URM5378. The antigens produced with NGTA were standardized by titers, protein content and identifications of proteins fraction. The titers of antigens produced were of 1/4, 1/8 e 1/32 and the protein content was 541µg per ml, 658µg per ml and 808 µg per ml for strains URM3634, 3635 and 5378 respectively; the exoantigens apresented several antigenic fractions. The serological tests immunodiffusion (ID), counterimmunoelectrophoresis (CIE) and Immunobloting (IB) were made with serum samples obtained from a bank of sera. The ID and CIE tests presented 86.0% and 98.0% of sensitivity, respectively. The IB test realized with 29 sera showed that all it (100%) recognized the 43-KDa molecule, gp 43, considered to the main antigen used for immunodiagnostic of PCM. All of the tests expressed 100% specificity.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Thermoconversion. Antigens. Seradiagnosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE	12
2.2 PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS	13
2.3 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO	15
2.3.1 Método de água destilada esterilizada	16
2.3.2 Sob óleo mineral	18
2.4 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i>	19
2.4.1 Padronização imunológica de antígenos	21
2.4.2 Padronização química de antígenos	22
2.5 PROVAS SOROLÓGICAS	23
2.5.1 Teste de Imunodifusão - I D	23
2.5.2 Contraímunoeletroforese – CIE	24
2.5.3 Imunoblot – IB	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
APENDICE A - VIABILIDADE, MORFOLOGIA E TERMOCONVERSÃO DE CULTURAS DE PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS ESTOCADAS NA COLEÇÃO DE CULTURAS MICOTECA URM, RECIFE, BRASIL	50
APENDICE B - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES SOROLÓGICOS DE IMUNODIFUSÃO DUPLA E CONTRAÍMUNOELETROFORESE NO DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	62
APENDICE C - IMPORTÂNCIA DO IMUNOBLLOT NO DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	76

1 INTRODUÇÃO

Na história da paracoccidioidomicose (PCM), destacam-se os nomes de Adolfo Lutz, Afonso Splendore e Floriano Almeida com relatos dos primeiros casos da doença no Brasil e estudo do agente etiológico. A doença foi observada pela primeira vez no Brasil por Adolfo Lutz em 1908, o qual a denominou de blastomicose brasileira; posteriormente Splendore (1912) relata novos casos da doença denominando como agente etiológico *Zymonema brasiliense*; chamando atenção da semelhança nas características entre os seus cultivos e os obtidos por Lutz; bem como as manifestações clínicas das lesões com localização na mucosa oral (LACAZ *et al.*, 2002).

Finalmente desde 1930, a doença foi denominada paracoccidioidomicose, tendo como agente etiológico *Paracoccidioides brasiliensis* (ALMEIDA, 1930; SPLENDORE, 1912).

A preservação de culturas de fungos patogênicos ao homem, como *P. brasiliensis*, é importante para pesquisa e biotecnologia. Assim, a escolha correta do método de preservação para cada espécie, monitoramento periódico para verificação da morfologia, patogenicidade e estabilidade genética, e outros estudos são necessários para o entendimento dos problemas relacionados às condições de estoque, a fim de ser selecionado o melhor método de preservação para cada espécie (LIMA; BORBA, 2001; LIMA *et al.*, 2004).

Vários métodos têm sido descritos para preservação de culturas de fungos, todos apresentam vantagens e desvantagens. A escolha do método de preservação depende da disponibilidade da coleção de culturas, tempo de preservação, estabilidade genética, características fenotípicas das culturas e de outros fatores (BUENO; GALLARDO, 1998; PANIZZO *et al.*, 2005; SMITH; ONIONS, 1994).

A Coleção de Culturas Micoteca URM Recife, Brasil, mantém culturas preservadas em duplicata em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967), sob óleo mineral (SHERF, 1943) e liofilização (RAPER; ALEXANDER, 1945).

Nas infecções fúngicas, nenhum procedimento é superior à identificação patognomônica de estruturas fúngicas nas amostras clínicas e/ou em cortes histológicos de tecidos, bem como o isolamento do agente etiológico; contudo essas situações ideais nem sempre são possíveis e freqüentemente são empregados procedimentos sorológicos, como Imunodifusão Dupla (ID) com resultados positivos tão seguros que mesmo com baixo título é indicativo de infecção (LACAZ *et al.*, 2002; MARINEZ, 2004; YASUDA- SHIKANAI *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de vários métodos sorológicos com grande sensibilidade e especificidade têm mostrado uma expansão e melhor compreensão da imunologia das micoses (LACAZ *et al.*, 2002; MARINEZ, 2004; YASUDA- SHIKANAI *et al.*, 2006).

Os testes sorológicos empregados no diagnóstico e controle de cura têm sido avaliados de acordo com a eficiência baseada na sensibilidade e especificidade. Frequentemente são usados no mínimo dois métodos, imunodifusão (ID) e contraímuno eletroforese (CIE) recomendados para fazer o diagnóstico sorológico (CAMARGO *et al.*, 2003; DEL NEGRO *et al.*, 1991; RESTREPO, 1992).

Pacientes com PCM não mostram deficiência na produção de anticorpos, mas a hiperatividade da resposta imune humoral, os quais resultam em altos títulos de anticorpos e hipergamaglobulina (CAMARGO; FRANCO, 2000).

A interação parasita-hospedeiro nas micoses sistêmicas mostra uma ativa relação entre as defesas do hospedeiro e a evasão dos fungos, tanto em hospedeiros naturais, o homem, como em animais de experimentação (LACAZ *et al.*, 2002; MARINEZ, 2004).

A utilização de antígenos com parâmetros definidos e técnicas padronizadas é importante no diagnóstico e acompanhamento da evolução clínica dos pacientes; assim antígenos são importantes para estudo de suas propriedades e como reagentes para diagnóstico (LACAZ *et al.*, 2002; MARINEZ, 2004; YASUDA- SHIKANAI *et al.*, 2006).

Isolados de *P. brasiliensis* variam quanto à curva de crescimento, características ultra-estruturais, composição de antígeno e molecular indicando que PCM pode ser causada por diferentes amostras do fungo (CAMARGO; FRANCO, 2000).

A importância de um diagnóstico preciso e rápido desta micose reside em promover terapia antifúngica, a fim de evitar aumento de dano pulmonar e disseminação do fungo a outros órgãos, e o desenvolvimento de fibrose (RESTREPO; TOBO´N, 2005).

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram realizar a termoconversão, produção e padronização de exoantígenos de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* na fase leveduriforme, selvagem e de culturas obtidas na Coleção de Culturas Micoteca URM e realizar o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Paracoccidioidomicose (PCM), é uma micose sistêmica granulomatosa prevalente em zonas rurais da América Latina, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (ALMEIDA, 1930; SPLENDORE, 1912). A doença afeta principalmente os pulmões de onde se dissemina a outros órgãos produzindo injúrias secundárias na mucosa, pele, nódulos linfáticos e glândulas adrenais; fibrose pulmonar pode aparecer como seqüela incapacitante da doença e na ausência de uma terapia efetiva, PCM progride e pode ser fatal (BRUMMER *et al.*, 1993).

As áreas de endemicidade estendem-se da Argentina à América Central, com alta incidência no Brasil (BLOTTA *et al.*, 1999), tem sido uma das mais prevalentes micoses profundas dessa região (RESTREPO, 1985; SAN-BLAS *et al.*, 2002; YASUDA-SHIKANAI, *et al.*, 2006).

A infecção é adquirida entre 10 e 20 anos, quando propágulos do fungo na fase filamentosa são inalados através da via respiratória, converte-se à fase leveduriforme, com primo infecção pulmonar podendo se disseminar por via sangüínea e ou linfática a todas as partes do corpo, com manifestação da doença entre 30 e 50 anos, pela reativação do foco endógeno latente; sendo mais comumente observada em indivíduos adultos do sexo masculino com freqüência de 10 a 15 homens para uma mulher, contudo na infância a freqüência é uniformemente distribuída em ambos os sexos, com ligeiro predomínio no masculino em adultos jovens (RIPPON, 1982; CAMARGO; FRANCO, 2000; YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006).

Esta micose apresenta múltiplas manifestações clínicas, como paracoccidioidomicose infecção, paracoccidioidomicose doença, forma aguda/subaguda, formas crônica unifocal, crônica multifocal e forma residual ou seqüelar; quando não diagnosticada e tratada a tempo, pode levar a formas graves disseminadas e letais (YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006). A importância do diagnóstico rápido e preciso desta micose, reside em iniciar terapia específica, a fim de evitar aumento no dano pulmonar, disseminação do fungo a outros órgãos e o desenvolvimento de fibrose (CORREA *et al.*, 2006).

Trata-se de um problema de saúde pública pelo alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras, principalmente para trabalhadores rurais, os quais

apresentam grandes deficiências de acesso aos serviços de saúde, o que favorece ao diagnóstico tardio (YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006).

Ao contrário de outras micoses, a PCM não está comumente relacionada à doença imunossupressora, contudo há relatos desta micose à infecção pelo HIV, neoplasias e raramente a pacientes submetidos a transplantes de órgãos (LACAZ *et al.*, 2002; YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006).

O padrão ouro para o diagnóstico da PCM é a detecção de estruturas leveduriformes sugestivas de *P. brasiliensis* em parasitismo observadas em espécimens clínicos, pela obtenção da cultura (BIALEK *et al.*, 2000; VIDAL *et al.*, 2005; YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006) e por testes sorológicos usados frequentemente como uma ferramenta no diagnóstico (ALMEIDA *et al.*, 2002; BLOTTA *et al.*, 1993; CORREA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2003).

A avaliação imunológica deve ser realizada em todas as formas clínicas e usada para valiosas informações no prognóstico e atividade da doença, essenciais para o acompanhamento clínico e controle de cura (YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006).

Pacientes com PCM não mostram deficiência na produção de anticorpos, mas hiperatividade da resposta imune humoral resulta em altos títulos de anticorpos e hipergamaglobulina (CAMARGO; FRANCO, 2000).

O título de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* tem correlação com a gravidade das formas clínicas, sendo mais elevados na forma juvenil (YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006).

Os critérios de cura são clínicos, radiológicos e imunológicos; podendo ser mencionados o desaparecimento dos sinais e sintomas da doença, cicatrização de lesões, melhora respiratória e recuperação do peso corporal; estabilização das imagens cicatriciais radiológicas pulmonares; títulos de anticorpos negativos ou títulos baixos, menores ou iguais a 1/2 detectados pela prova sorológica de imunodifusão dupla (YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006).

2.2 PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

Paracoccidioides brasiliensis (ALMEIDA, 1930; SPLENDORE, 1912) é agente etiológico da paracoccidioidomicose; é um fungo termodimórfico, conhecido apenas em sua forma assexuada. Este fungo cresce a temperatura de 25°C na fase miceliana (M) e na fase leveduriforme (Y) quando incubado a 37°C ou invadindo o tecido do hospedeiro (LACAZ *et al.*, 2002).

O habitat desse fungo é representado pelo reino vegetal e o solo. De espécimens clínicas, foi isolado pela primeira vez por Lutz (1908) e Splendore (1910) utilizando ágar Sabouraud, a temperatura ambiente (Lacaz *et al.*, 2002).

O processo do dimorfismo em *P. brasiliensis* é reversível e complexo envolvendo alguns processos bioquímicos e moleculares, receptores hormonais, contudo a temperatura, independente da composição do meio de cultura representa o principal parâmetro envolvido no termodimorfismo (LACAZ, 1994; LACAZ *et al.* ; SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1994, 2002).

O mecanismo pelo qual as células leveduriformes são convertidas à forma miceliana e vice-versa ainda permanece desconhecido; contudo muitos estudos foram realizados para explicar a conversão da Y para M (LACAZ, 1994; SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1994).

Estrutura da parede celular, metabolismo da glicose, ciclo da 3'5 adenosina monofosfato (cAMP), receptores hormonais e outros fatores estão envolvidos na transição morfológica de *P. brasiliensis*. α e β 1,3 glucana atuam de forma importante na morfologia e dimorfismo, assim α glucana é inibida no brotamento, ao passo que beta 1,3-glucana é produzida continuamente. A respiração endógena é superior na fase Y do que na fase M, contudo isso é insuficiente para explicar o mecanismo do dimorfismo; adição exógena de cAMP, bem como inibidores fosfodiester ao meio de cultivo, previnem a transformação da fase M em Y e vice-versa; Hormônios esteróides como corticosterona, progesterona e estrógeno podem diretamente afetar a patogenicidade desse fungo; assim hormônios esteróides inibem a transição de M para Y em dose dependente. A síntese de RNA é inibida durante as fases iniciais da transformação, o qual é responsável pela produção de filamentos micelianos (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1994).

San-Blas *et al.* (1993) verificaram que o ajoeno, obtido do *Allium sativum* (alho) inibe o crescimento do fungo em ambas fases, sendo a Y mais sensível. A ornitina–descarboxilase é de grande importância no processo de brotamento e na transformação da fase M-Y (SAN-BLAS *et al.*, 1996).

As colônias de *P. brasiliensis* não crescem rapidamente, iniciando o desenvolvimento entre 20 a 30 dias de incubação; à temperatura ambiente as colônias são brancas, aderentes ao meio, microscopicamente são observados filamentos micelianos finos, septados, aleuroconídios globosos, em clavas e artroaleuroconídios, podendo apresentar clamidoconídios intercalares. A 37°C as colônias são chamadas cerebriformes ou leveduriformes, microscopicamente são detectadas células arredondas com duplo contorno refringente, com ou sem brotação, a brotação múltipla com o aspecto de “roda de leme” é característica de *P. brasiliensis* (LACAZ, 1994; LACAZ *et al.*, 2002; RIPPON, 1982).

Várias Coleções de Culturas preservam *P. brasiliensis* pelos métodos de Castellani (1967) e de Sherf (1943) ou raramente pelo método de Raper e Alexander (1945). Nos Laboratórios de Micologia Médica, as culturas são mantidas por repiques sucessivos a cada três meses (LACAZ *et al.*, 2002).

2.3 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

O impulso no desenvolvimento da Microbiologia, a partir do século XIX, tanto no campo da patologia humana e veterinária quanto no campo das indústrias, evidencia a importância dos microrganismos, dentre estes os fungos (FIGUEIREDO, 2001).

Com isso, a preservação e manutenção de culturas de fungos tornaram-se essenciais para eficácia e segurança de produtos usados no diagnóstico e tratamento de micoses que afetam ao homem e outros animais, assim como para os estudos taxonômicos e comparativos de novos isolados, para o treinamento de pessoal especializado, produção de fármacos e de químicos e para ensaios de qualidade. Contudo, o desenvolvimento de todas essas atividades depende da preservação de culturas em bom estado de conservação (NEUFELD; SARQUIS, 2003).

A maneira mais eficaz de se conservar microrganismos de importância em pesquisa básica e aplicada é a preservação *ex-situ* em coleções de culturas. Fungos isolados e identificados, quando preservados por processos adequados podem ser mantidos por longos períodos (CANHOS, 2003).

O principal objetivo da preservação de culturas é manter as mesmas em estado viável, sem mudanças morfológicas, fisiológicas e genéticas, características importantes quando as culturas são requeridas para pesquisas. Para garantir a completa viabilidade e estabilidade dos organismos estocados, são utilizados métodos de preservação que têm basicamente o mesmo princípio, retardar ou parar o metabolismo celular dos fungos. Nesse sentido, inúmeros processos podem ser utilizados (NEUFELD; SARQUIS, 2003; SMITH; ONIONS, 1994).

As coleções de culturas, centros de conservação e exploração de recursos genéticos e metabólicos de microrganismos e de culturas de tecidos têm a função de obter microrganismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas tornando-os disponíveis aos usuários interessados (CANHOS, 2003; CANHOS *et al.*, 2007).

As culturas puras obtidas de coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais (CANHOS, 2003).

De acordo com Figueiredo (2001) as primeiras coleções eram inicialmente mantidas por repicagens periódicas e constantes, o que, sem dúvida, era um trabalho exaustivo. Além disso, problemas como perda da viabilidade, alterações morfofisiológicas, decréscimo ou perda da capacidade de esporulação e de patogenicidade, constantemente apareciam em culturas após repiques sucessivos, em meios naturais e artificiais. Assim, para preservação desse patrimônio, tornou-se necessário desenvolver outros métodos que fossem menos dependentes do trabalho humano, e que mantivessem as culturas viáveis e menos sujeitas a variações.

Dentre os métodos mais utilizados para preservação de culturas, podem ser usados subcultivos sucessivos, em água destilada esterilizada, sob óleo mineral, solo ou areia, sílica-gel, nitrogênio líquido, liofilização e congelamento (FIGUEIREDO, 2001; MALIK; HOFFMANN, 1993; SMITH; ONIONS, 1994).

A Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, foi fundada em 1954 pelo Professor Augusto Chaves Batista e está registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) sob a sigla URM (University Recife Mycology). É filiada ao World Federation for Culture Collections (WFCC) sob o número 604, sendo citada em vários catálogos, destacando-se American Type Culture Collection (ATCC) nos Estados Unidos; Institute for Fermentation em Osaka no Japão (IFO); World Data Center for Microorganisms (WDCM) no Japão (MICOTECA, 2007). O acervo da Coleção de Culturas Micoteca URM consta de 8.000 culturas de fungos, todas identificadas em nível de espécie e mantidas em duplicata em cada método de preservação. Nesta Coleção, são usados os métodos água destilada esterilizada, proposto por Castellani (1967), sob óleo mineral proposto por Sherf (1943) e liofilização por Raper e Alexander (1945). Tem sido usados por várias coleções de culturas, com resultados diferindo para cada espécie. Assim, nenhuma técnica apresenta sucesso quando aplicada a todos os fungos (LIMA; BORBA, 2001; MICOTECA, 2007; RODRIGUES *et al.*, 1992).

2.3.1 Método de água destilada esterilizada

Proposto por Castellani (1939, 1967) para evitar o problema do pleomorfismo em fungos de interesse médico inicialmente, neste método foi utilizado água destilada e, posteriormente, água destilada esterilizada. É um processo que consiste no seguinte: preenchimento de frascos de vidro esterelizados, do tipo empregado para antibióticos, com

4mL de água destilada esterilizada; transferindo para água contida nos frascos fragmentos do meio com cultura jovem de preferência da parte periférica das culturas onde as hifas estão em desenvolvimento; fechar os frascos com tampas de borracha esterilizada e lacrar hermeticamente com tampas de alumínio para evitar contaminação e perda de água; armazenar os frascos de vidros à temperatura 12 °C a 24 °C com condicionadores de ar ou em refrigeradores (SMITH; ONIONS, 1994).

Além da preservação de fungos de interesse médico, este método também é indicado à preservação de fungos mitóspóricos, zygomycetes, ascomycetes e basidiomycetes, incluindo àqueles sem importância médica (SMITH; ONIONS, 1994).

Dentre os fungos patógenos ao homem pesquisados, com relação à viabilidade, pureza, alterações morfofisiológicas e estabilidade, merecem destaque os dermatófitos, espécies de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Fonsecaea*, *Fusarium*, e os fungos termodimórficos *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *P. brasiliensis*, *Sporothrix scheenckii* (BUENO; GALLARDO, 1998; PANIZO *et al.*, 2005; QIANGQIANG *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 1992).

Rodrigues *et al.* (1992) estudaram culturas preservadas de seis a 24 meses, a viabilidade de fungos e actinomicetes de interesse médico preservados em água destilada estocadas na Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Foram testadas 174 amostras, dentre estes, os fungos dimórficos *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis* apresentam redução na viabilidade com o decorrer do tempo. Com relação as cinco culturas de *P. brasiliensis*, uma perdeu a viabilidade após seis meses de preservação e ao final de dois anos apenas uma amostra estava viável.

Períodos de estocagem de 2 a 3 anos em água destilada esterilizada garante a preservação dos fungos sem que haja perda da viabilidade (SMITH; ONIONS, 1994). Entre outros autores, não há um consenso sobre qual o tempo mínimo de estocagem com este método (QIANGQIANG *et al.*, 1998; SMITH; ONIONS, 1994).

Segundo Pasarell e McGinnis (1992), Smith e Onions (1994) e Qiangqiang *et al.* (1998) apesar do progresso alcançado na conservação de fungos, a água destilada esterilizada continua ocupando um lugar de preferência, por ser este um método simples, econômico e seguro, capaz de garantir a sobrevivência dos cultivos de fungos por períodos prolongados e, ao mesmo tempo, evita o pleomorfismo e a contaminação por ácaros.

2.3.2 Sob óleo mineral

Método proposto por Sherf (1943), consiste em recobrir culturas jovens crescidas em meios de cultura específicos para desenvolvimento do fungo a ser preservado, contido em tubo de ensaio, com uma camada de 1cm de altura de óleo mineral. A manutenção pode ser à temperatura ambiente ou de acordo com a necessidade do fungo, sendo os tubos mantidos permanentemente na posição vertical para que o óleo não toque nos tampos de algodão (SMITH; ONIONS, 1994).

Segundo Smith e Onions (1994) este método apresenta vantagens como viabilidade de algumas espécies por períodos prolongados de estoque, reduz a contaminação por ácaros, processo simples e econômico não necessitando de equipamentos onerosos.

Este método de preservação é indicado, principalmente, para fungos esporulantes, dentre estes, aqueles de interesse médico, como dermatófitos, *Epidermophyton floccosum*, espécies de *Microsporum* e *Trychophyton*; as leveduras, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*; fungos filamentosos, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Exophiala dermatitidis* e fungos filamentosos dimórficos *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *S. schenckii* defendem Schonborn (1989), Silva *et al.* (1994), Neufeld (1996), Lima e Borba (2001), Perez *et al.* (2003), Lima *et al.* (2004) e Panizo *et al.* (2005).

Silva *et al.* (1994) com o objetivo de avaliar a viabilidade e alterações morfológicas, analisaram 70 culturas de *P. brasiliensis* mantidas na Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz inicialmente preservadas por repiques sucessivos e posteriormente sob óleo mineral à temperatura ambiente e estocadas desde 1923 a 1992. Os resultados mostraram viabilidade de 26% considerada relativamente baixa para o período de nove a 10 anos de preservação. Algumas culturas apresentaram transição micromorfológica e apenas duas culturas foram capazes de completar o processo dimórfico.

Lima e Borba (2001) verificaram a viabilidade, características morfológicas e habilidade dimórfica de fungos preservados sob óleo mineral e solo, estocados por um período que variou de oito a 49 anos. Os resultados obtidos com a preservação sob óleo evidenciaram baixa viabilidade de culturas de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* com 25% e 0,52% respectivamente e para *S. schenckii* a viabilidade de 69,8% foi considerada significativa. Com relação à preservação em solo nenhuma cultura mostrou viabilidade.

Lima *et al.* (2004) avaliaram o dimorfismo *in vitro* e *in vivo* de fungos filamentosos dimórficos, como *P. brasiliensis*, preservados sob óleo mineral. Demonstraram que as duas

culturas de *P. brasiliensis* apresentaram transição micromorfológica e não foram capazes de completar o dimorfismo até mesmo após passagem *in vivo*.

2.4 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Os primeiros antígenos de *P. brasiliensis* foram preparados por Fonseca e Leão (1927), a partir de filtrados de culturas, os quais foram usados nas provas cutâneas.

Almeida *et al.* (1945) prepararam três tipos de antígenos denominados paracoccidioidina I obtido de células leveduriformes mortas, II de pús diluído e esterilizado por calor e III de um filtrado de cultivo em meio de Sabouraud, todos usados em provas cutâneas.

Posteriormente, aos dados obtidos por Almeida *et al.* (1945), vários inquéritos epidemiológicos foram realizados em países da América do Sul, onde se podem destacar os trabalhos de pesquisadores pioneiros do Brasil, Argentina, Colômbia e outros (LACAZ *et al.*, 2002).

Lacaz, em 1945, realizou vários estudos para obtenção de antígenos com várias culturas em meio de Sabouraud líquido; Fava Netto (1955 apud Lacaz *et al.*, 2002) que fundamentou e demonstrou a utilidade das provas sorológicas.

Mackinnon *et al.* (1953), prepararam paracoccidioidina de filtrados na fase leveduriforme de várias culturas em meio de Smith, utilizando a técnica originalmente descrita para obtenção de coccidioidina. Os testes cutâneos foram realizados com o filtrado 1/10 e a positividade foi de 2,0%. Nestes trabalhos não foram mencionados portadores de paracoccidioidomicose, embora os resultados demonstrem que os reatores tiveram contato com *P. brasiliensis*.

Lacaz *et al.* (1959) com filtrado de micélio diluído 1/10 e 1/100 preparado e padronizado por Mackinnon, realizaram provas cutâneas obtendo positividade de 4,72% em indivíduos da cidade de São Paulo; nos indivíduos paracoccidioidino-positivos foi verificado o comportamento imunológico através das provas de fixação do complemento e de precipitação.

Fava Neto e Raphael (1961) elaboraram um antígeno polissacarídico, a partir de células na fase leveduriforme, tratadas por autoclave e utilizado na diluição de 1/10, com positividade de 87% nos pacientes com paracoccidioidomicose.

Restrepo e Schneidou (1967) utilizaram antígenos ativos de filtrados de culturas na fase filamentosa e na fase leveduriforme os quais foram precipitados com etanol e usados em provas cutâneas.

A estrutura antigênica de *P. brasiliensis* tem demonstrado que a composição do antígeno sofre variações a depender de vários parâmetros, dificultando a obtenção de diversos lotes com qualidades idênticas (TRAVASSOS, 1994).

Paracoccidioides brasiliensis expressa várias substâncias antigênicas as quais podem ser reconhecidas por anticorpos em soros de pacientes ou em animais imunizados em laboratório. As substâncias são heteropolissacarídeos, glicoproteínas, glicolipídeos e complexos de composição mista (TRAVASSOS, 1994). Assim, os antígenos produzidos para imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose podem ser extratos sônicos da fase leveduriforme, filtrados concentrados, filtrados liofilizados obtidos da massa celular ou exoantígenos, a partir de culturas de *P. brasiliensis* na fase filamentosa ou leveduriforme, usadas nas formas brutas ou frações purificadas (CAMARGO; FRANCO, 2000).

Os exoantígenos são moléculas secretadas e excretadas por culturas de *P. brasiliensis* os quais revelam por eletroforese várias frações antigênicas (YARZÁBAL *et al.*, 1977).

Muitas preparações antigênicas têm sido relatadas nos últimos anos por vários autores (CAMARGO *et al.*, 1988; CAMARGO *et al.*, 2003; DEL NEGRO *et al.*, 1989; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1994; NEGRONI, 1968; SIQUEIRA, 1982).

As condições usadas para obter esses antígenos variam em relação aos componentes do meio de cultura, tempo de cultivo, amostra fúngica, temperatura de crescimento, tamanho do inóculo, culturas sob agitação ou estacionárias possibilitando preparações antigênicas diferentes que podem variar na atividade e qualidade até dentro do mesmo laboratório (BRUMER *et al.*, 1984; MCGOWAN; BUCLEY, 1985; NEGRONI; NEGRONI, 1968; RESTREPO; DROUHET, 1970; RESTREPO; MONCADA, 1972; RESTREPO *et al.*, 1984; YARZÁBAL *et al.*, 1977).

Camargo *et al.* (1988) verificaram que a partir de culturas com sete dias de crescimento, obtinham um exoantígeno denominado ag7 rico em gp43 e considerado ideal para o uso nos testes de imunodifusão.

Um esforço para padronizar o processo de obtenção de antígeno foi tentado por Camargo *et al.* (1988) e Camargo *et al.* (2003), os quais verificaram que culturas com tempo de cultivo de 7 a 15 dias na fase leveduriforme em meio de Negroni modificado por SIQUEIRA (1982), obtiveram antígeno rico em gp43 denominado ag7, considerado ideal para os testes de imunodifusão. Contudo, Del Negro *et al.* (1989) mostram que antígenos

preparados com culturas com 10 dias em meio NGTA (tiamina, glicose, tiamina, asparagina) são perfeitamente adequados para o uso nesta técnica.

Entre os antígenos de *P. brasiliensis*, a glicoproteína de peso molecular 43KDa (gp43) identificada, caracterizada por Puccia *et al.* (1986) e purificada por Puccia *et al.* (1991), a qual corresponde ao antígeno de E₂ Yarzabal *et al.* (1977) e à banda 1 detectada no teste de imunodifusão descrita por Restrepo e Moncada (1974) e arco A obtida em imunoeletroforese por Restrepo e Drouhet (1970) foi também caracterizada por Stambuk *et al.* (1988), Mendes-Giannini *et al.* (1989) e Travassos *et al.* (1995). Esta glicoproteína foi a mais importante contribuição nos estudos sorológicos da paracoccidioidomicose, destacando-se pelo significado imunológico, sendo o mais importante antígeno desse fungo (CAMARGO; FRANCO, 2000), a qual tem sido amplamente utilizada no imunodiagnóstico e designada como antígeno específico. A banda 1 é detectada no soro de aproximadamente 95 a 98% de pacientes com paracoccidioidomicose e permanece por períodos consideráveis de tempo. Assim, Mendes-Giannini *et al.* (1994) consideram a gp43 um importante marcador imunológico, a qual desaparece do sangue circulante com a evolução clínica da doença favorável pela medicação antifúngica.

Além do antígeno E₂ de Yarzabal *et al.* (1977), devido à heterogeneidade antigênica os exoantígenos de *P. brasiliensis* produzem três faixas de precipitação denominadas 1, 2 e 3, quando as amostras são cultivadas em neopeptona, tiamina e asparagina, comumente é detectado o antígeno específico gp43 ou E₂, que representa 80 a 90% nas preparações antigênicas quando analisados em gel de poliacrilamida podendo ser usados no diagnóstico da paracoccidioidomicose (CAMARGO; FRANCO, 2000; LACAZ *et al.*, 2002; TRAVASSOS, 1994).

Preparações antigênicas brutas estáveis foram reportadas como sendo altamente específicas todas referem à presença da gp43 (TRAVASSOS, 1994).

2.4.1 Padronização imunológica de antígenos

Exoantígenos brutos devem ser padronizados por provas sorológicas. Recomendam-se, pelo menos, duas provas, sendo as provas de precipitação em gel de ágar imunodifusão (ID) e gel de agarose contraimunoeletroforese (CIE) as mais comumente utilizadas, segundo Siqueira e Rodrigues, 2002; a fim de verificar a atividade antigênica, determinando titulação através da diluição ótima do antígeno. A titulação do antígeno corresponde à mais alta diluição com positividade nítida com o soro e o mesmo número de bandas de precipitação

comparando a um antígeno padrão; a diluição ótima do antígeno será aquela capaz de reagir com o mais alto título do soro.

Na padronização, o antígeno é utilizado na forma total e diluído nas proporções de 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 até proporções sucessivas as quais são colocadas a difundir, frente a soros reconhecidamente positivos e negativos para o antígeno em questão.

Para determinar a diluição ótima do antígeno, usa-se o critério de padronização cruzada, onde antígeno e soro são diluídos nas mesmas proporções 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 até proporções sucessivas.

Os testes empregados no sorodiagnóstico e controle da paracoccidioidomicose têm sido avaliados de acordo com a eficiência a qual é baseado na sensibilidade e especificidade (DEL NEGRO *et al.*, 1989).

Para determinação da especificidade são usados também soros de indivíduos sadios e soros positivos de pacientes com outras micoses como histoplasmose, doença de Jorge Lobo, aspergilose, a fim de determinar a especificidade do referido antígeno (DEL NEGRO *et al.*, 1991; DEL NEGRO *et al.*, 1995; DEL NEGRO *et al.*, 2000).

A alta especificidade dos testes de ID e CIE pode ser comprovada pela comparação com soro de pacientes com outras micoses profundas. Os testes revelam uma baixa porcentagem de reações cruzadas que ocorrem, principalmente, com soros de pacientes com histoplasmose e aspergilose, como já relatado na literatura (DEL NEGRO *et al.*; 1991; DEL NEGRO *et al.*; 1995; DEL NEGRO *et al.*, 2000).

Os antígenos devem apresentar as seguintes características: fácil preparação, grande especificidade, alta sensibilidade, conservação indefinida, constância dos resultados e serem utilizados em mais de uma prova sorológica (ROBLES, 1983).

Nos exoantígenos brutos, a detecção das frações protéicas é evidenciada no gel de poliacrilamida em dodécil sulfato de sódio (SDS-PAGE) o que se faz necessário para a prova de Imunoblot (IB) (CAMARGO; FRANCO, 2000).

2.4.2 Padronização química de antígenos

Para determinação da concentração de proteínas, são recomendados os métodos de Lowry *et al.* (1951) e Bradford (1976), segundo Camargo e Scaletsky (2002).

2.5 PROVAS SOROLÓGICAS

Os primeiros estudos sorológicos da paracoccidioidomicose foram realizados por Moses (1916) o qual demonstrou a presença de anticorpos circulantes no soro contra componentes de *P. brasiliensis* na prova de fixação do complemento, utilizando um extrato aquoso da fase micelial desenvolvido em meio ágar Sabouraud e desde então tem sido uma das principais ferramentas para o diagnóstico (DEL NEGRO *et al.*, 2000).

As provas sorológicas, detectando e quantificando anticorpos circulantes, têm importância não apenas no diagnóstico e prognóstico, como também na avaliação da resposta do hospedeiro ao tratamento. Nas últimas décadas, várias técnicas foram propostas e usadas no imunodiagnóstico; dependendo da prova, a concentração de anticorpos é igual ou superior a 0,003mg/mL (CAMARGO, 2004; LACAZ *et al.*, 2002; YASUDA- SHIKANNAI *et al.*, 2006).

2.5.1 Teste de Imunodifusão – ID

Ferri (1961) foi o primeiro a relatar a observação de precipitação entre soro de pacientes com paracoccidioidomicose e antígenos de *P. brasiliensis* em gel de ágar.

Várias formas modificadas do teste de ID têm sido empregadas desde a sua introdução por Ouchterlony (1949).

Este apresenta alta especificidade e um grau de sensibilidade relativamente baixa detectando no mínimo de 3µg de anticorpos por mililitro. Com esta técnica, Del Negro *et al.* (1991) constatarem 100% de especificidade.

Usualmente, ID é o método de escolha para detecção de anticorpos em soro de pacientes com PCM, com positividade entre 60 a 100%, usando preparações de exoantígenos onde a gp43 é a molécula predominante representando 80 a 85% do total da composição antigênica (CAMARGO *et al.*, 1988; CANO; RESTREPO, 1987; DEL NEGRO *et al.*, 1991; DEL NEGRO *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1994;). Silva *et al.* (2005) relatam positividade de 45,51% em pacientes com neuroparacoccidioidomicose com títulos de anticorpos variando de 1/4 e 1/16.

ID oferece várias vantagens tais como diagnóstico acurado, simplicidade técnica e poucos recursos laboratoriais. O risco de resultado falso negativo não pode ser descartado. Considerando a alta especificidade e a sensibilidade relativa, o teste de imunodifusão em gel

de ágar pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico da PCM (DEL NEGRO *et al.*, 1995).

2.5.2 Contraimunoeletroforese – CIE

Esta técnica é caracterizada pela alta sensibilidade detectando 1,25 µg de anticorpos por mL. O risco de reação cruzada é similar ou um pouco superior a ID. A técnica é realizada em gel de agarose com tampão alcalino; o tipo e o tamanho do poço, assim como a intensidade e tipo de corrente elétrica aplicada têm sido variáveis. São relatadas sensibilidades de 77 a 97% e especificidade entre 94 a 97% e até 100% (CAMARGO, 2004; DEL NEGRO *et al.*, 1991; DEL NEGRO *et al.*, 2000).

Em virtude da velocidade nos quais os resultados são obtidos, sugere-se esta técnica como a primeira na rotina para pesquisa de anticorpos nos soros de pacientes suspeitos (DEL NEGRO *et al.*, 2000).

2.5.3 Imunoblot – IB

A técnica de Wester Blot identifica antígenos envolvidos na resposta imune humoral de pacientes, após eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE) (CAMARGO, 2004; CAMARGO; FRANCO, 2000).

A técnica foi padronizada por Mendes-Giannini *et al.* (1986), Camargo *et al.* (1989), Ortega *et al.* (1992) e Blotta e Camargo (1993), usando exoantígenos da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* para diagnóstico e acompanhamento de cura da paracoccidiodomicose (LACAZ *et al.*, 2002).

Anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* reconhecem quatro componentes antigênicos: 70, 52, 43 e 20-21KDa. A maioria dos soros reconheceram o antígeno 43 KDa (CAMARGO *et al.*, 1989; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1986). Camargo *et al.* (1989) reconheceram o antígeno 43KDa como o mais freqüente e relata o antígeno 70KDa como relevante reconhecido por 96% dos soros de pacientes com PCM.

De maneira similar, ao uso de células na fase leveduriforme e células na fase filamentosa, como fontes de antígenos, confirmam que várias classes de imunoglobulinas exigem padrões diferentes de reatividade; bem como padrões diferentes de anticorpos, onde IgG foi principalmente ligada a gp43 enquanto IgM e IgA preferencialmente selecionada à banda 70KDa. Anticorpos específicos IgG e IgA reconhecem mais bandas do que aqueles da

classe IgM, mais freqüentemente nos casos agudos do que nos crônicos (LACAZ *et al.*, 2002).

Esta técnica tem sido usada para vários propósitos como identificação do padrão humoral de reatividade em pacientes, caracterização de antígenos citoplasmáticos do fungo na fase Y e M; análise de antígenos de superfície e ensaios para analisar expressão de exoantígenos (LACAZ *et al.*, 2002).

No imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose, usualmente, no mínimo, dois métodos (ID e CIE), são recomendados para fazer o diagnóstico, acompanhamento do paciente sob tratamento e para determinar o prognóstico de PCM, bem como, correlacionar a severidade da doença (BRUMMER *et al.*, 1993; CAMARGO *et al.*, 1989).

O uso extensivo desses procedimentos sorológicos é particularmente atribuído à variedade de apresentações clínicas desta micose e o tempo requerido para o isolamento do fungo de espécimes clínicos. Em algumas ocasiões, o resultado sorológico é a primeira indicação da natureza micótica da doença do paciente (DEL NEGRO *et al.*, 2000; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1994).

Os títulos de anticorpos mostram uma distribuição gaussiana e podem ser relacionados à severidade da infecção e às formas clínicas da doença (SHIKANNAI-YASUDA *et al.*, 2006). Ocasionalmente, resultados falso-negativos podem ser observados até quando as células de *P.brasiliensis* são detectadas em materiais biológicos, devido, provavelmente, à baixa atividade de anticorpos imunoglobulina G₂ contra epítomos de carboidratos, observados com quaisquer dos testes, na maioria das vezes se associam com lesões localizadas e com hospedeiros com AIDS ou outro tipo de imunossupressão (DEL NEGRO *et al.*, 1991; DEL NEGRO *et al.*, 1995; DO VALLE *et al.*, 2001; NEVES *et al.*, 2003; YASUDA-SHIKANNAI *et al.*, 2006).

Raramente, ID e CIE dão resultados falso-negativos, o que pode ser provavelmente devido à sensibilidade relativamente baixa nos testes de precipitação em gel, contudo com teste de IB anticorpos anti-gp43 podem ser demonstrados (DEL NEGRO *et al.*, 1995).

A freqüência dos testes positivos na paracoccidioidomicose varia de 90 a 95% podendo alcançar 100% de sensibilidade, dependendo do tipo do teste usado e do estágio da evolução da doença (DEL NEGRO *et al.*, 1991; DEL NEGRO *et al.*, 1995).

Poucos resultados falso positivos têm sido relatados até mesmo em pacientes com tuberculose, leprose, candidose, criptococose e aspergilose. Porém, reações cruzadas podem ser observadas com soros de pacientes com paracoccidioidomicose, histoplasmose e doença de Jorge Lobo, devido à existência de epítomos comum entre *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e

P. loboi. O grau de reação cruzada depende do tipo de antígeno usado, tipo de teste e a população analisada (DEL NEGRO *et al.*, 1991; DEL NEGRO *et al.*, 1995).

Do Valle *et al.* (2001) observaram em alguns casos resultados de ID falso-positivos mais freqüentes na forma juvenil comparando com a forma crônica; enquanto Vidal *et al.* (2005) relatam poucos casos em pacientes com a forma crônica localizada da doença, caracterizada pela baixa produção de anticorpos. Contudo, Vidal *et al.* (2005) relatam um caso de um paciente com paracoccidioidomicose disseminada, em cujo soro, não foi reconhecido gp43, mas foi revelado anticorpo anti-70KDa, que facilita o estabelecimento do fungo e progressão da doença no modelo experimental de infecção primária (MATO-GROSSO *et al.*, 2003).

Del Negro *et al.* (1991) constataram positividade no teste de ID em 42 do total de 46 pacientes com PCM (91,3%) e 100% de especificidade. A CIE foi positiva em 95,6% e também teve especificidade em 100%, sendo ligeiramente superior a ID.

Os autores sugerem que os laboratórios de micologia médica dêem prioridade aos testes de precipitação em gel de ágar e agarose no imunodiagnóstico da paracoccidioidomicoses (DEL NEGRO *et al.*, 1991).

De acordo com Del Negro *et al.* (2000) ID foi positivo em 95,3% de 43 pacientes incluídos neste estudo e no teste de CIE, todos os pacientes tiveram resultados positivos. Com os três testes ID, CIE e ELISA, apenas com CIE foram distinguidas as três formas clínicas (crônica unifocal, crônica multifocal e aguda) enquanto, ELISA foi capaz de distinguir apenas a forma unifocal da forma multifocal. As três técnicas mostraram uma tendência similar, com diminuição dos títulos de anticorpos associada com terapia. A associação entre severidade da doença e alta resposta de anticorpos pode ser importante no acompanhamento do prognóstico e no esquema terapêutico.

Silva *et al.* (2005) relatam positividade em apenas em 1 caso (7,2%) de amostra do fluido cérebro espinhal com ID, usando exoantígeno bruto de *P. brasiliensis* com título de 1:16. No soro de cinco (45,5%) pacientes do total de 11 tiveram ID positiva com títulos de anticorpos variando de 1/4 e 1/16 em dois desses pacientes. Por outro lado, com ELISA todas as amostras (100%) do fluido cérebro espinal foram positivas. Contudo a detecção de anticorpos ELISA convencional como uma rotina de trabalho laboratorial é um procedimento que consome mais tempo do que os procedimentos de detecção de antígenos.

Durante o tratamento de PCM, é importante estabelecer critérios de cura ou remissão; assim o uso de testes sorológicos adequadamente sensíveis combinados com exame micológico negativo e melhora da sintomatologia dos pacientes, provam o sucesso das

técnicas sorológicas, principalmente quando se observa um aumento nos títulos de anticorpos indicando recidiva da doença (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1994; YASUDA-SHIKANAI *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REATIVAÇÃO DE CULTURAS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Foram reativadas seis culturas de *P. brasiliensis* (2219, 2868, 3188, 3633, 3634, 3635) isoladas de espécimen clínicos preservadas em duplicata em água esterilizada e sob óleo mineral estocadas a 25°C na Coleção de Culturas Micoteca URM por um período que variou de 1968 a 1995 (Tabela 1) e e uma cultura selvagem isolada de esputo e depositada na referida coleção sob o número 5378 URM.

Fragmentos de culturas preservadas em água foram transferidos para a superfície dos meios ágar Sabouraud (Difco) e ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco) contidos em tubos de ensaio e em placas de Petri; das culturas preservadas sob óleo, os fragmentos foram transferidos para caldo glicosado contido em tubos de ensaio, mantidos a temperatura ambiente por 90 dias. Após crescimento, as amostras foram transferidas para ágar Sabouraud e ágar BHI a fim de verificar pureza e características morfológicas.

3.2 TERMOCONVERSÃO DE CULTURAS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

O processo do termodimorfismo M-Y foi realizado por subcultivos em caldo BHI e NGTA (neopeptona 1,6%; glicose 1%; tiamina 0,01% e asparagina 0,02%) incubados a 37°C a 120 rpm e as subculturas foram realizadas a cada sete dias para obter a fase leveduriforme. Os subcultivos foram realizados cinco vezes e as células preparadas com azul de Amann (6) e monitorizadas ao microscópico de luz Zeiss. Os critérios adotados para seleção das culturas fúngicas visando à obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* baseou-se nos aspectos macroscópicos das colônias bem como na termoconversão das células multibrotantes de *P. brasiliensis*.

3.3 PRODUÇÃO DE EXOANTÍGENOS

A produção de exoantígenos foi, de acordo com Negroni (1968), baseada na técnica de Evans e Kessel (1951), modificada por Siqueira (1982).

Antígenos de filtrados de culturas (AgPb) de três isolados de *P. brasiliensis* 3634, 3635 e 5378 foram preparados de células na fase leveduriforme cultivadas em 100 mL do meio NGTA contido em frascos Erlenmeyer de 500mL e incubadas a 37°C sob agitação a 120

rpm por sete dias. Após este período, o conteúdo de 100 mL foi transferido para 500 mL de NGTA contido em frasco Erlenmeyer de 1000 mL e incubado a 37°C sob agitação a 120 rpm por 15 dias. As células foram atenuadas com timerosal (0,2 g/L), separadas por filtração a vácuo usando papel de filtro (Reagen, RJ, Brazil) e posteriormente filtradas através de membrana Millipore de 0,22µm. Em seguida, o volume do filtrado foi concentrado em 10 a 20 vezes o volume e dialisado durante 48 horas com água destilada.

Foram produzidos três lotes de cada antígeno. O mesmo lote de cada antígeno foi usado durante o estudo na concentração de 20 vezes o volume e não diluído. Após produção, as preparações antigênicas foram padronizadas por técnicas sorológicas e químicas, posteriormente, divididos em pequenos volumes e estocados a -20°C até o uso.

Após produção e preparações os exoantígenos brutos foram padronização imunológica realizada através das técnicas sorológicas de imunodifusão dupla (ID) e contraímuno eletroforese (CIE) usados no imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose; a padronização química foi determinada à concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976) e avaliadas por SDS-PAGE.

3.4 PADRONIZAÇÃO DE EXOANTÍGENOS DE CULTURAS DE *PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS*

3.4.1 Padronização imunológica de exoantígenos

Nos procedimentos de padronização imunológica são usualmente recomendadas duas técnicas sorológicas como ID e CIE de acordo com Siqueira e Rodrigues (1982 apud Lacaz *et al.*, 2002).

O antígeno foi usado não diluído e diluído 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 para ID e CIE, contra soro positivo. O título do antígeno foi determinado de acordo com a mais alta diluição do soro com positividade nítida e o mesmo número de bandas de precipitação comparado ao antígeno padrão adquirido da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara. Por outro lado, na padronização cruzada, antígenos e soros foram usados diluídos em proporções iguais 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16. A melhor diluição do antígeno foi determinada de acordo com o mais alto título do soro reagente, sendo usado de dois soros controle positivos.

3.4.2 Padronização química de antígenos

Para padronização química dos antígenos produzidos para imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, foi determinada a concentração de proteínas pelo método de Bradford (5) segundo Camargo e Scaletsky (2002 apud LACAZ *et al*, 2002).

3.5 PROVAS SOROLÓGICAS

3.5.1 Imunodifusão Dupla (ID)

Imunodifusão dupla (ID) foi realizada em lâminas de vidro (75x25mm) revestidas com 1 mL de ágar purificado (Difco) a 1% em água destilada, secas e posteriormente recobertas com 3 mL do gel composto de ágar purificado (Difco) a 1% em solução fisiológica contendo 0,4% de citrato de sódio e 0,01% de timerosal. O poço central foi preenchido com 10µl do antígeno e os poços periféricos com 10µl de soro de referência e soros de pacientes testes. As lâminas foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente ($TA = 28 \pm 2^\circ C$) por 48 horas. Posteriormente, as mesmas foram lavadas em salina, secadas e coradas com solução a 0,4% de azul de Coomassie (Sigma) e descorada com uma solução de ácido acético glacial a 5%.

3.5.2 Contraimunoeletroforese (CIE)

Contraimunoeletroforese (CIE) foi conduzida em lâminas de vidro (75x25mm) revestidas com 1 mL de ágar purificado (Difco) a 1% em água destilada, secadas e posteriormente recoberta com 3 mL de gel composto de agarose a 1% em tampão veronal pH 8.2. Os poços do lado anódico da lâmina foram preenchidos com 10µl dos soros de referência e soros testes e os poços do lado catódico foram preenchidos com 10µl do antígeno. As lâminas foram submetidas à eletroforese contendo tampão veronal pH 8.2 e corrente de 6 mA por lâmina durante 90 minutos. Os procedimentos de lavar, secar e corar as lâminas foram os mesmos usados na ID.

Os resultados de ambos os testes foram considerados positivos quando uma ou mais bandas foram detectadas.

3.5.3 Imunoblot (*Western blot*)

A realização desta técnica é antecedida da execução da técnica de Dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE

Os antígenos foram diluídos em tampão de amostra (0,5 M Tris-HCl, 2% glicerol, 5% Beta-mercaptoetanol, 0,5% de azul de bromofenol, pH 6.8), para obtenção de uma concentração de 20µg/mL de proteínas. As amostras foram separadas por SDS-PAGE-10%, com sistema da BIO-Rad (Laemmli, 1970). Foi utilizado um padrão de massa molecular com proteínas de 29- 116 kDa (Sigma-aldrich).

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (0,22µm) (Sigma, St. Louis, MO, USA), por 2h a 150 mA e 1h a 100 mA, usando sistema da BioRad, de acordo com Towbin et al. (1979). As membranas foram bloqueadas por 16h a 4°C em tampão TBS-Tween (0,1%, pH 7.4), contendo caseína 2,5%. Em seguida, as membranas foram incubadas, por 2h a 37°C, com soros diluídos 1:50 em TBS-caseína 1%. A membrana foi lavada 3X vezes em tampão TBS-Tween, 10 min cada. Posteriormente, as membranas foram incubadas, por 1h, com conjugado anti-IgG-HRP humana (Sigma). Foram lavadas 3 vezes e, a reação foi revelada com Tetrametil benzidina (TMB) por 5 min.

3.6 AMOSTRAS DE SOROS

As amostras de soros foram adquiridas do banco de soros (Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara e do Centro Especializado em Micologia Médica, UFC, Ceará) obtidas de pacientes com prévio diagnóstico de PCM, histoplasmose e aspergilose, de acordo com o método de diagnóstico padronizado de exame direto, isolamento em cultura e testes sorológicos positivos. Esses soros foram primeiramente aliquotizados e estocados a -20°C, para obter reprodutividade dos resultados.

Um total of 61 amostras de soros foram examinados, 43 de pacientes com PCM, seis com histoplasmose, seis com aspergilose e seis indivíduos controles saudáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VIABILIDADE DE CULTURAS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

De seis culturas preservadas sob óleo mineral, 83,3 % (2868, 3188, 3633, 3634, 3635) estavam viáveis durante 19 e 10 anos; nenhuma amostra mantida em água destilada esterilizada estava viável (Tabela 1). Os resultados demonstram que a amostra de *P. brasiliensis* 2219 estava inviável nos dois métodos, possivelmente devido ao período de 37 anos de preservação da cultura original estocada em 1968 sendo subcultivada em 1986 e mantida na Coleção de Culturas Micoteca URM por 19 anos (Tabela 2).

No método de preservação em água destilada esterilizada proposta por Castelanni (3), inicialmente para manutenção de fungos de interesse médico, não foi constatada viabilidade em nenhuma das seis culturas de *P. brasiliensis* estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM. Os resultados obtidos demonstram que culturas de *P. brasiliensis* preservados em água destilada esterilizada em coleções de culturas requer monitoramento periódico nos subcultivos, esses dados estão corroborados por Rodrigues *et al.* (1992) que estudando durante dois anos cinco culturas, verificaram que a viabilidade diminui com o tempo; esses autores indicam a grande importância no controle dos subcultivos de *P. brasiliensis* preservados por este método.

De acordo com outros autores, o método de Castellani (1967) é simples e economicamente viável para coleções de culturas de pequeno tamanho com bons resultados. Contudo, em maiores coleções de culturas, é necessário menor tempo de subcultivo, escolha do tempo exato de intervenção para induzir crescimento e desenvolvimento restrito de cada amostra, são fatores essenciais para o sucesso da preservação (BUENO; GALLARDO, 1998; PANIZZO *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 1992).

Os resultados de viabilidade obtidos com amostras de *P. brasiliensis* preservados sob óleo mineral, por um período que variou de 19 e 10 anos, foram superiores (83,3%) aos de Silva *et al.* (1994) que obtiveram viabilidade de 26% com culturas estocadas de nove a dez anos na Coleção de Cultura da Fundação Oswaldo Cruz. Nossos resultados estão de acordo com Lacaz *et al.* (2002), que comprovam a longevidade deste fungo capaz de crescer bem à temperatura ambiente, por longo tempo. Por outro lado, Lima e Borba (2001) trabalhando com amostras de fungos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* verificaram diminuição da viabilidade e melhores resultados com *Sporothrix schenckii*.

Várias Coleções de Culturas preservam *P. brasiliensis* pelos métodos de Castellani (1967) e de Sherf (1943) ou, raramente, pelo método de Raper e Alexander (1945). Nos Laboratórios de Micologia Médica, as culturas são mantidas por repiques sucessivos, a cada três meses (LACAZ *et al.*, 2002).

A sobrevivência de culturas de *P. brasiliensis*, estocadas em coleções de culturas pode ser afetada pelo tempo prolongado de preservação (LIMA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 1992). Figueredo (2001) considera que esse método pode ser melhorado pela substituição da água destilada por solução fisiológica salina para equilibrar a pressão osmótica.

4.2 TERMOCONVERSÃO DE CULTURAS DE *PARACOCIDIOIDES BRASILIENSIS*

De acordo com os resultados da termoconversão, a amostra 5378 apresentou habilidade de conversão da fase M-Y no segundo subcultivo, e às culturas 3634 e 3635 após o quinto subcultivo; as amostras 2868, 3188, 3633 apresentaram morfologia transitória e a cultura 2219 estava inviável.

As culturas 3634 e 3635 na fase micelial a 25°C apresentaram colônias cotonosa, com alguns tufo de micélio aéreo e superfície algodonosa variando de branca a bege, mostrando fissuras e filamentos finos com conídios, nenhuma das quais é características de *P. brasiliensis*. Por outro lado à obtenção da fase leveduriforme ocorreu após vários subcultivos, mostrando colônias de cor creme, cerebriforme como levedura e células com parede dupla, birrefringente e brotamento múltiplo de *P. brasiliensis* (Figura 1).

As amostras 2868, 3188 e 3633 cresceram a 25°C apresentando colônias cerebriformes (Figura 1) produzindo macromicromorfologia transitória tornando-se incapaz de completar o processo dimórfico, provavelmente, pelo tempo de estoque 19, 15 e 10 anos respectivamente. Termoconverção M-Y é previamente estabelecida, porém, podem falhar em culturas preservadas por longo tempo, provavelmente, pela baixa concentração de oxigênio e presença de metabólitos tóxicos acumulados sob o óleo (BORBA *et al.*, 2005; LIMA; BORBA, 2001; LIMA *et al.*, 2004).

Os padrões morfológicos atípicos apresentados pelas amostras, e a perda da habilidade dimórfica estão de acordo com (Rodrigues *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2000; Borba *et al.*, 2005).

As estruturas fúngicas evidenciadas a partir da termoconversão demonstraram que as referidas culturas depositadas na Coleção de Culturas Micoteca URM são compatíveis às

descritas por Lacaz *et al.* (2002), Rippon (1982) e Sidrim e Rocha (2004) como *P. brasiliensis*.

Os resultados da termoconversão M-Y são previamente estabelecidos, porém podem falhar em culturas preservadas por longo tempo, provavelmente pela baixa concentração de oxigênio e presença de metabólitos tóxicos acumulados sob o óleo (BORBA *et al.*, 2005; LIMA; BORBA, 2001; LIMA *et al.*, 2004).

Os experimentos realizados para avaliar a viabilidade, padrão morfológico e processo dimórfico (M-Y) permitiram selecionar as amostras de *P. brasiliensis* 3634 e 3635 e uma cultura 5378 selvagem para produção e padronização de antígenos usados no imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose.

Tabela 1 - Culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM Recife, Brasil.

Nº da amostra	Substrato	Métodos de preservação	Ano de preservação
	Esputo	ADE/ÓM	1968 1986*
	Esputo	ADE/ÓM	1986
	Esputo	ADE/ÓM	1990
	Esputo	ADE/ÓM	1995 2001*
	Esputo	ADE/ÓM	1995 2001*
	Esputo	ADE/ÓM	1995 2001*

ADE = Água Destilada Esterilizada; ÓM = Óleo Mineral; * = Ano de Reativação

Fonte: A Autora, 2007

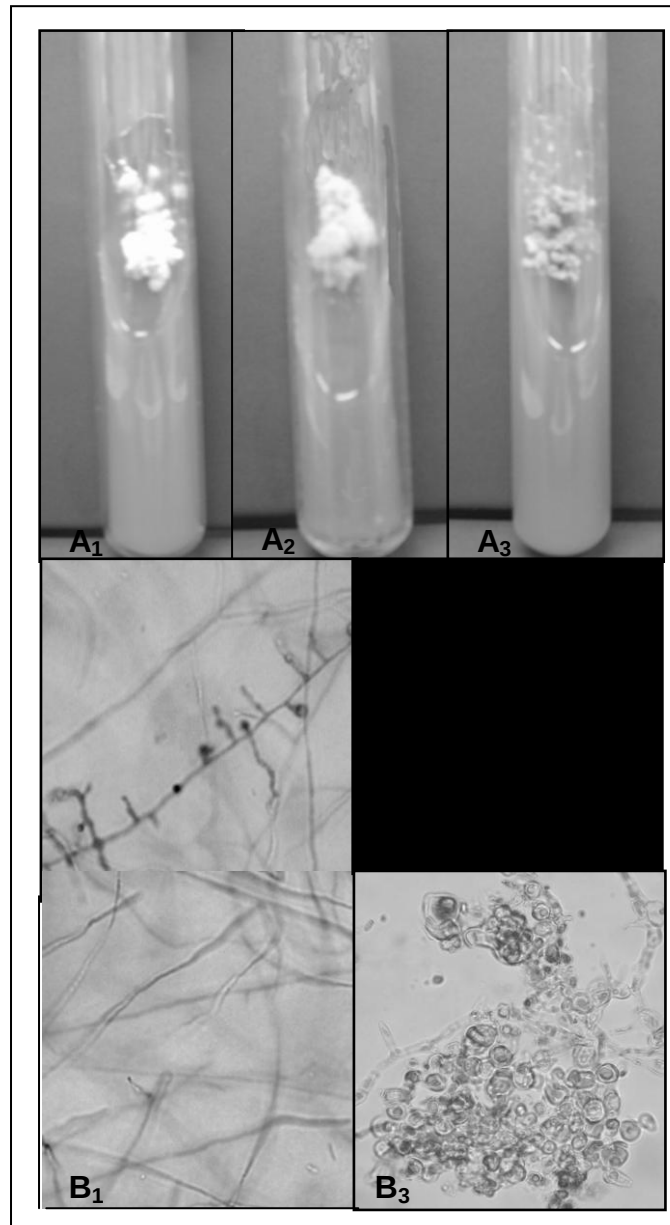
Tabela 2 - Teste de viabilidade de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* estocadas Coleção de Culturas Micoteca URM Recife, Brasil.

Nº da amostra	Ano de Preservação	Métodos de preservação	
		ADE	OM
	1968 1986*	-	-
	1986	-	+
	1990	-	+
	1995 2001*	-	+
	1995 2001*	-	+
	1995 2001*	-	+

ADE = Água Destilada Esterilizada; ÓM = Óleo Mineral; * = Ano de Reativação; - = Cultura Inviável; + = Cultura Viável.

Fonte: A Autora, 2007.

Figura 1. Características Macro-micromorfológica (A e B) de amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* typical at 25°C (A₁, B₁) and 37°C (A₂, B₂) and atypical at 25°C (A₃, B₃) in Brain Heart Infusion.



Fonte: A Autora, 2007.

4.3 PRODUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE EXOANTÍGENOS DE CULTURAS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Os testes revelaram que os antígenos forneceram especificidade de 100% em todos os soros testados os quais foram positivos para com paracoccidiodomicose ativa, enquanto soros de pacientes com histoplasmose, aspergilose e controles sadios não reagiram.

A concentração de proteínas foi de 541µg/mL, 658µg/mL e 808µg/mL e o título dos antígenos produzidos foi de 1/4, 1/8 e 1/32 das culturas 3634, 3635 e 5378 respectivamente.

Os testes de ID com os três antígenos foram positivos em 37 (86,0%) soros de 43 pacientes com paracoccidiodomicose ativa incluído nesse estudo. Soros de seis pacientes com histoplasmose, seis com aspergilose e seis de doadores sadios não reagiram, indicando 100% de especificidade dos antígenos de *P. brasiliensis*.

4.4 PROVAS SOROLÓGICAS

Os testes de ID e CIE foram positivos com soros de 10 pacientes com paracoccidiodomicose ativa; soros de pacientes com histoplasmose, aspergilose e indivíduos sadios como controles não reagiram.

Os resultados de soros de 37 pacientes que reagiram através da ID com os antígenos de *P. brasiliensis* produzidos com as culturas 3634 e 3635, foram obtidos com soros totais e com títulos de anticorpos de até 1/32; por outro lado o antígeno obtido com a cultura 5378 reagiu com soros totais e com títulos de anticorpos de até 1/128.

Os testes de CIE com os três antígenos foram positivos com 42 (98,0%), soros de 43 pacientes portadores de paracoccidiodomicose e expressaram também 100% de especificidade.

Os resultados de 42 soros que reagiram através da CIE com os antígenos de *P. brasiliensis* das culturas 3634 e 3635 reagiram com soros totais e com títulos de anticorpos de até 1/64; enquanto o antígeno obtido com a cultura 5378 reagiu com soros totais e com até 1/512.

O longo período de estoque das culturas de *P. brasiliensis* 3634 e 3635 mantidas sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM desde 1995 podem ter contribuído para menor sensibilidade comparando com a amostra 5378.

De acordo com Kurokawa *et al.* (2005) e Stevens *et al.* (1997) a adaptação de células fúngicas a métodos de estocagem com redução da atividade metabólica, pode envolver

regulação de genes que de alguma maneira pode afetar a expressão de determinantes de virulência.

A sensibilidade de 86,0% e alta especificidade de 100% constatadas com ID, também foram relatadas por outros autores, com sensibilidade variando de 65% a 100% dependendo do tipo de antígeno usado, os quais concluíram que este teste sorológico é uma importante ferramenta no diagnóstico da PCM (Del Negro *et al.*, 1991; Del Negro *et al.*, 1995; Do Valle *et al.*, 2001; Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Neves *et al.*, 2003; Restrepo *et al.*, 1984).

Neste trabalho foram obtidos resultados falso negativos com os soros de seis (14,0%) pacientes com o teste de ID e um (2%) com CIE. Os resultados confirmam a importância do uso de no mínimo dois métodos para diagnóstico sorológico. Outros autores relatam resultados falso negativos com soro de pacientes com PCM ativa (Del Negro *et al.*, 1991; Del Negro *et al.*, 1995; Do Valle *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2003).

A análise dos resultados sugere o grande valor dos testes de ID e CIE no sorodiagnóstico de PCM ativa. Ambos os testes mostraram alto grau de sensibilidade e especificidade, sendo CIE ligeiramente superior a ID.

Neves *et al.* (2003) afirmam que resultados sorológicos negativos podem ser observados até mesmo quando células de *P. brasiliensis* são encontradas em materiais biológicos; esses casos podem ser relacionados à baixa avidéz de anticorpos imunoglobulina G2 guiada contra epítomos de carboidratos.

Os resultados, obtidos com testes de ID e CIE, mostraram alto grau de sensibilidade e especificidade de 100% com todos os soros testados de pacientes com PCM ativa. O teste de CIE é considerado com sensibilidade entre 77% e 97% e especificidade de no mínimo 95,0%; é considerada a sensibilidade igual ou ligeiramente superior à fornecida pela ID (Del Negro *et al.*, 1991; Del Negro *et al.*, 1995; Do Valle *et al.*, 2001; Mendes-Giannini *et al.*, 1994; Restrepo *et al.*, 1984).

Os resultados com ID e CIE foram também observados por DEL NEGRO *et al.* (1991) ao verificarem no teste de ID positividade em 42 (91,3%) de 46 pacientes com PCM ativa e 100% de especificidade; os testes com CIE foi 95,6% e teve também 100% de especificidade; ambos os testes mostraram alta eficiência, sendo CIE ligeiramente superior à ID. De acordo com Del Negro *et al.* (2000) ID foi positivo em 95,3% com soro de 43 pacientes incluídos no estudo e de todos os pacientes os resultados foram positivos com teste de CIE. Silva *et al.* (2003) com o teste de ID constataram resultados positivos em cinco (45,5%) soros de 11 pacientes com neuroparacoccidioidomicose, com títulos de anticorpos variando de 1/4 e 1/16 para duas amostras desses soros.

A detecção de anticorpos específicos pode ser útil no diagnóstico da PCM, bem como no monitoramento da evolução da doença e resposta ao tratamento (Sandhu *et al.*, 1997). Associação entre severidade da doença e resposta alta de anticorpos pode ser importante na avaliação do prognóstico do paciente e seguimento do tratamento (Del Negro *et al.*, 2000).

Os autores sugerem que os laboratórios de micologia médica devam dar prioridade aos testes de precipitação em gel de ágar e agarose no imunodiagnóstico da PCM (Del Negro *et al.*, 1991).

Até o momento, grandes avanços têm sido reportado na imunopatologia de micoses. Diagnóstico baseado na detecção de anticorpos é útil no diagnóstico de micoses sistêmicas principalmente PCM e sua sensibilidade e especificidade depende tanto do antígeno quanto do teste usado (Camargo; Franco, 2000).

Yasuda-Shikanai *et al.* (2006) concluíram que ID representa vantagens sendo a melhor opção pela simplicidade do teste, baixo custo, sensibilidade superior a 80% e especificidade de 90% e a experiência acumulada recomenda este teste para diagnóstico sorológico da PCM. Os componentes dos exoantígenos brutos de *P. brasiliensis* foram analisados por SDS-PAGE e após coloração com prata, foram observadas frações protéicas, incluindo o componente gp43 o principal antígeno de *P. brasiliensis* usado para diagnóstico.

Os resultados obtidos com IB foram comparados com alguns anteriormente obtidos com ID e CIE usando os mesmos antígenos e soros.

Os componentes dos antígenos Pb3635 e Pb5378 URM foram demonstrados por SDS-PAGE e, após coloração com prata, foram observadas várias bandas, incluindo o componente de 43 KDa (Figura 2).

Soros de 29 pacientes com PCM não tratados foram testados para anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* por ensaio de IB e todos (100%) demonstraram anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis*, sete (24,0%) não reagiram com ID, um (3,5 %) não reagiu com CIE. Soros de doadores sadios e de pacientes com histoplasmose e aspergilose não reagiram nestes ensaios.

A glicoproteína de 43 KDa, gp43, é encontrada em *P. brasiliensis*, sendo o mais importante antígeno desse fungo (Camargo *et al.*, 1988; Cisalpino *et al.*, 1996). A mesma é excretada pela célula durante a fase leveduriforme, sendo o principal antígeno para o diagnóstico de PCM. Nossos dados com os antígenos Pb3635 (dados não mostrados) e Pb5378 (Figura 3) também demonstraram a importância de gp43 para o diagnóstico de PCM por IB.

Neste trabalho foi detectado um caso, com resultado falso negativo para ID e CIE, paciente 13, (Figura 3). Do Valle *et al.* (2001) e Vidal *et al.* (2005) constataram que

resultados falso negativos com ID e CIE são normalmente relatados quando pacientes apresentam baixos títulos de anticorpos IgG, contudo IB detecta esses baixos níveis desses anticorpos.

O componente de 43 KDa foi reconhecido por IgG em 16 soros (Figura 2) e 13 soros (dados não demonstrados), como também foi constatado por (Camargo *et al.*, 1991; Camargo *et al.*, 1988; Cisalpino *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003).

Vários investigadores têm usado a abordagem de imunoblot para estudar a resposta humoral para PCM. Contudo, as preparações antigênicas usadas nestas pesquisas são exoantígenos de filtrados brutos de culturas de diferentes idades (Camargo *et al.*, 1989; Casotto *et al.*, 1991; Mendes-Giannini *et al.*, 1990).

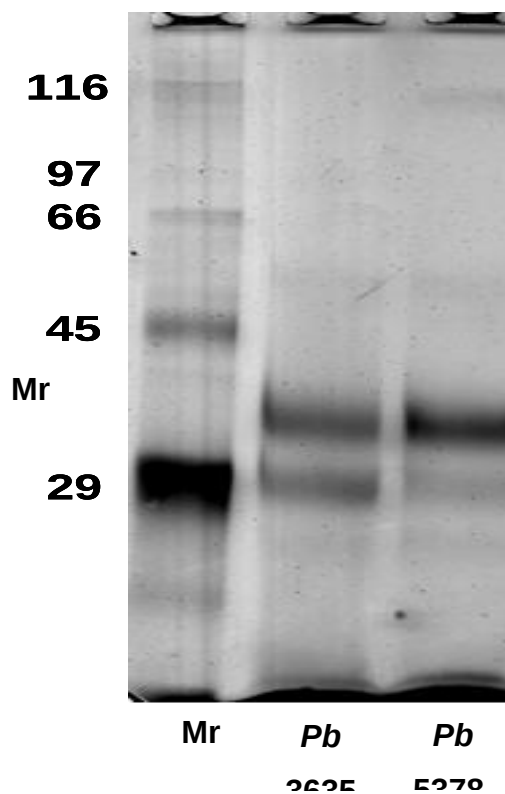
Até agora, a molécula 43 KDa tem sido considerada o principal antígeno para diagnóstico de PCM e induz a uma resposta imune protetora (TABORDA *et al.*, 1998; TRAVASSOS *et al.*, 1995). Entretanto, várias outras glicoproteínas de 22-25 KDa (FIGUEROA *et al.*, 1994); 27 KDa (McEwen *et al.*, 1996), 58 KDa (Figuerola *et al.*, 1995), 70 KDa (Camargo *et al.*, 1989) e 87 KDa (Gómez *et al.*, 1997), têm sido amplamente reconhecidas no soro de pacientes com PCM.

Vidal *et al.* (2005) relatam um caso de um paciente com PCM disseminada em cujo soro não foi reconhecida gp43, mas foi revelado anticorpo anti-70KDa; Souza *et al.* (1997) têm sugerido que nem todos epítomos de antígenos expressados por gp43 estão igualmente presentes em todas as amostras de *P. brasiliensis*; Mato-Grosso *et al.* (2003) afirma que gp70 KDa facilita o estabelecimento do fungo e progressão da doença no modelo experimental de infecção primária.

Para estudos sorológicos, sugere-se a cultura 5378URM a qual contém antígeno específico que foi reconhecido por 100% de soros de pacientes com PCM.

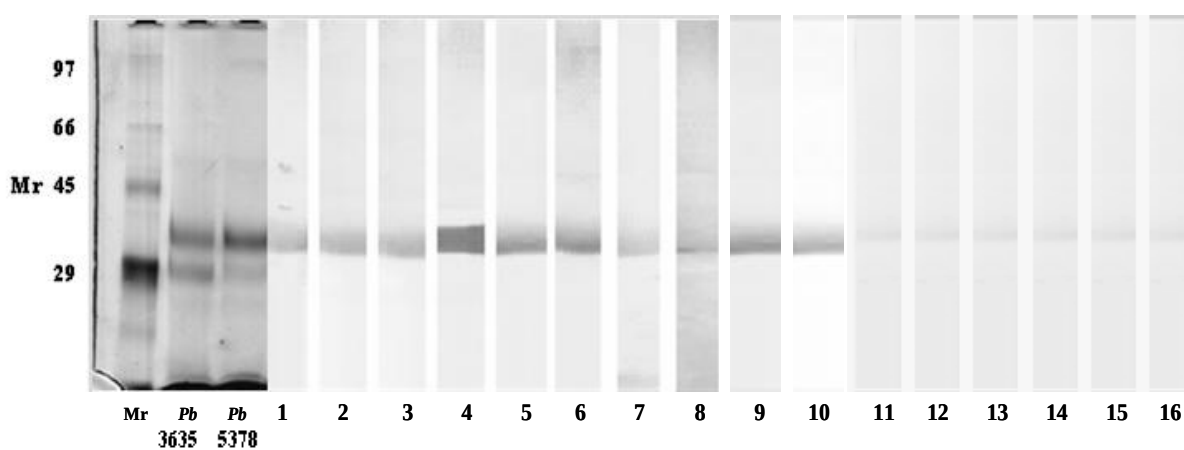
Através da IB obtém-se resultados positivos com soros de pacientes com baixos títulos, portanto esta técnica é de fundamental importância no imunodiagnóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com PCM.

Figura 2 - Componentes de exoantígeno bruto de URM *P. brasiliensis* 3635 e 5378 após SDS-PAGE e coloração com prata. Padrão de massa molecular está indicado na esquerda.



Fonte: A Autora, 2007

Figura 3 - SDS-PAGE de extrato de *P. brasiliensis* 3635 e 5378 e imunoblot de soro de pacientes com paracoccidioidomicose (1-16).



Fonte: A Autora, 2007

5 CONCLUSÕES

A preservação sob óleo mineral é um método adequado para manutenção de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Água destilada esterilizada é um método inadequado para preservação de culturas de *P. brasiliensis*.

Células leveduriformes, multibrotantes e refringentes obtidas através da termoconversão confirmam *P. brasiliensis*.

Culturas de *P. brasiliensis* podem apresentar transição morfológica.

Imunodifusão, contraímunoeletroforese e imunoblot são indicadas para diagnóstico e monitoramento da paracoccidioidomicose.

Imunoblot é a técnica sorológica mais sensível para diagnóstico da paracoccidioidomicose.

O antígeno da cultura selvagem de *P. brasiliensis* 5738URM expressou melhor antigenicidade.

Especificidade e título são parâmetros fundamentais para caracterizar antígenos.

Título e especificidade do antígeno associados a sensibilidade das provas sorológicas são parâmetros fundamentais para diagnóstico e monitoramento da paracoccidioidomicose.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. P.; LACAZ, C. S.; CUNHA, A. C. Intradermorreação para o diagnóstico da blastomicose sul-americana (Granulomatose paracoccidióidica). **Anais Brasileiros de Medicina**, v. 35, p. 267-272, 1945.
- ALMEIDA, S.M.; QUEIROZ-TELLES, F.; DOI, E. M.; ONO, M.; WERNECK, L. C. Anti-gp43 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. **American Journal Clinica Pathology**, v.118, p. 864-868, 2002.
- BIALEK, R.; IBRICEVIC, A. A.; EPINUS, C.; NAJVAR, L. K.; FOTHERGILL, A. W.; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J. R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in Tissue samples by a Nested PCR Assay. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2940–2942, 2000.
- BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 671-676, 1993.
- BLOTTA, M. H. S. L.; MAMONI, R. L.; OLIVEIA, S. J.; NOVÉR, A. S.; PAPAIRDAMON, P. M. O.; GOUVEIA, A.; CAMARGO, Z. P. Paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in southeast region. **American Journal of Tropical Medical and Hygiene**, v. 61, p. 390-394, 1999.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyse of Biochemycal**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUMER, S. O.; JALBERT, M.; KAUFMAN, L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 19, p. 404-407, 1984.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical of Microbiology Review**, v. 6, p.89-117, 1993.
- BUENO, L.; GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micoogia**, v, 15, p.166-168,1998.
- CAMARGO, Z. P.; SCALETSKI, C. A. Técnicas micológicas e imunológicas. Técnicas de coloração em micologia. Micopatologia. Meios de cultivo. Preparação de antígenos micóticos. Métodos bioquímicos e munoquímicos para o estudo de antígenos fúngicos. Prova de PCR. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARRI, E. M.; MELO, N. K. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1104 p.
- CAMARGO, Z. P. Diagnóstico imunológico das infecções fúngicas. In: SIDRIM, J. J. C; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1º ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

CAMARGO, Z. P. Técnicas imunológicas em micologia. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1º ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, p. 41-48, 2000.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, 26: 2147-2151, 1988.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; TRAVASSOS, L. R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens by immunoblotting. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 27, p. 404-412, 1989.

CAMARGO, Z. P.; BERZAGHI, R.; AMARAL, C. C.; MARQUES DA SILVA, S. H. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Medical Mycology**, v. 41, p. 539-542, 2003.

CANHOS, V. P. X Centros de Recursos Biológicos: Suporte ao Desenvolvimento Científico e Inovação Tecnológica. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 82-101, 2003.

COLEÇÕES DE MICROORGANISMOS. CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. p. 82-101. Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v72cap03.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2007.

CANO, L. E.; RESTREPO, A. Predictive value of serological tests in the diagnosis and follow up of patients with paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, p. 276-283, 1987.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medical and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medical Hygiene**, v. 42, p. 226-226, 1939.

CORREA, M. M.; BEDOYA, A. M.; GUERRERO, M. P.; MÉNDEZ, J.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses**, v. 50, p. 41-47, 2006.

DEL NEGRO, G. M. B.; BENARD, G.; ASSIS, C. M.; VIDAL, M. S. M.; GARCIA, N. M.; OTANI, C.; SHIKANAI-YASYDA, M. A.; LACAZ, C. S. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. **Journal of Medical Veterinary and Mycology**, v. 33, p. 11-116, 1995.

DEL NEGRO, G. M. B.; GARCIA, N. M.; RODRÍGUEZ, E. G.; CANO, M. S. N.; AGUIAR, M. S. M. V.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina de São Paulo**, v. 33, n. 4, 377-280, 1991.

DEL NEGRO, G. M. B.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; GARCIA, N. M.; ASSIS, C. M.; LACAZ, C. S. Occurrence of 43 Kda glycoprotein (GP43) in different culture filtrates of *P. brasiliensis*, strains FMUSP113. **Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis**, Caracas, Venezuela, 1989.

DEL NEGRO, G. M. B.; PEREIRA, C. N.; ANDRADE, H. F.; PALACIOS, S. A.; VIDAL, M. M. S.; CHARBEL, C. E.; BENARD, G. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p.37–46, 2000.

DO VALLE, A. C. R. L.; COSTA, P. C.; FIALHO, M.; VON HELDER, J.; MUNIZ, M. M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 39, p. 373–377, 2001.

FAVA NETTO, C.; RAPHAEL, A. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul americana. **Revista do Insituto de Medicina Tropical de São. Paulo**, v. 3, p. 161-165, 1961.

FERRI, R. G. Estudo imunoquímico de antígenos intracelulares. **Hospital**, v. 59, p. 917- 923, 1961.

FIGUEREIDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 73-82, 2001.

FONSECA FILHO, O., LEO, A. E. A. Reaction cutanée spécifique avec le filtrat de culture de *Coccidioides immitis*. **Biology**, v. 97 , p.1796-1797, 1927.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Fanco, M. F., Lacaz, C. S.; Restrepo, A., Del Negro, G. **Paracoccidioidomycosis**. 1º ed, Flórida: CRC Press, 1994.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VACCARI, E. M. H.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ªed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1104 p.

LACAZ, C.S. Contribuição para o estudo da “blastomicose-infecção”. Inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidino-positivos. **Revista do Insituto de Medicina Tropical de São. Paulo**, v. 1, p. 245-259, 1959.

LIMA, R. F.; BORBA, C. M. Viability and morphological characteristics and dimorphic ability by different methods. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 191-196, 2001.

LIMA, R. F.; SANTOS, B. M. M.; SCHFFER, G. G.; LIMA, O. C.; BORBA, C. M. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral oil. **Canadian of Journal of Microbiology**, v.50, p. 445-449, 2004.

LOWRY, D. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Criterion measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological and Chemical**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACKINNON, J. E.; SRTAGAVEYTIA, A. R. C.; ARROYO, L. Sobre la especificidad de la intradermorreaccion con paracoccidioidina. **Anais da Faculdade de Medicina**, v. 38, p. 363-382, 1953.

MALIK, K. A.; HOFFMANN, P. Long-term preservation of yeast culture by liquid drying. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 372-383, 1993.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In: **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. SIDRIM, J. J. C; ROCHA, M. F. G. 1º ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

MATO-GROSSO, D.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, D. Characterization of gp 70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 71, p. 6534-6542, 2003.

McGOWAN, K. L.; BUCLEY, H. R. Preparation and use of cytoplasmatic antigens for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 39-43, 1985.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, A. W.; MASUSA, A. Detection of 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2842-2845, 1989.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DEL NEGRO, G. M.; SIQUEIRA, A. M. SERODIAGNOSIS. In: FRANCO, M. F.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 1º ed, Flórida: CRC Press, 1994.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, A. W.; STOLF, A. M. S. Immunochemical study of *Paracoccidioides brasiliensis* by Western blotting. In: **Encontro Internacional de Paracoccidioidomycosis**, Colombia, 1986.

MICOTECA URM. Pernambuco, Disponível em <http://www.ufpe.br/micoteca> Acesso em: 24 ago.

MOSES, A. Fixação de complemento en la paracoccidioidomicosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 68- 74, 1916.

NEGRONI, R. Nuevos studios sobre antígenos para las pruebas serologicas en la blastomicosis sudamericana. **Dermatologia Ibero Latinoamericana**, v. 4, p. 409-416, 1968.

NEGRONI, R., NEGRONI, P. Antigenos del *Paracoccidioides brasiliensis* para las reacciones serologicas. **Mycopathologia**, v. 34, n. (3/4, p. 285-288, 1968.

NEUFELD, P. M. **Viabilidade e alterações biomorfológicas em cepas de dermatófitos preservadas sob óleo mineral e em água destilada na coleção de culturas de fungos do Instituto Oswaldo Cruz**. Dissertação (Mestrado em Micobiologia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1996, 110p.

NEUFELD, P. N.; SARQUIS, M. I. M. Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 3, p. 147-150, 2003.

NEVES, A. R.; ROSSI, R. L. C L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. S. L. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clinical Diagnosed Laboratory Immunology**, v. 5, p. 802-807, 2003.

ORTEGA, G.; VILLANUEVA, E.; PEREIRA, J.; SALMA, N.; ALBORNOZ, M. B. Characterization of the *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. Serological immunodiagnosis using Western blotting. **Acta Ciencia Venezuela**, v. 43, p. 355-359, 1992.

OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Pathology Microbiology Scand**, v. 26, p. 507-515, 1949.

PANIZZO, M. M.; REVIÁKINA, V.; WILLIAMS, M.; GONZÁLEZ, G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. **Revista da Sociedade Venezuelana de Microbiologia**, v. 25, n. 1, p. 43-53, 2005.

PASARELL, L.; MCGINNIS, M. R. Viability of fungal culture maintained at - 70°C. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1000-1004, 2005.

PÉREZ, C.; MATA-ESSAYAG, S; HARTUNG, D. C. A. C.; ROSELLÓ, A.; COLELLA, M. T.; OLAIZOLA, C.; LANDAETA, M. E. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. **Revista da Sociedade Venezuelana de Microbiologia**, v. 23, n. 2, p. 153-157, 2003.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection of Immunity**, v. 53, p. 199-206, 1986.

PUCCIA, R.; TAKAOKA, D. T.; TRAVASSOS, L. R. Purification of of the 43 KDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 29, p. 57-69, 1991.

QIANGQIANG, Z.; JIAJUN, W.; LI, L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. **Mycoses**, v. 41, n. 5/6, p. 255-257, 1998.

RAPER, K. B.; ALEXANDER, D. F. Preservation of molds by lyophil process. **Mycologia**, v. 37, p. 499-525, 1945.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; CANO, L. E.; OCHOA, M. T. A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 22, p. 23-29, 1984.

RESTREPO, A.; DROUHET, E. Étude des anticorps précipitants dans la blastomycose sud-américaine par l'analyse immunoélectrophorétique des antigènes de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annales. Institute Pasteur**, v. 119, p. 338-346, 1970.

RESTREPO, A.; MONCADA, L. H. Characterization of precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Applied of Microbiology**, v. 28, p. 138-144, 1974.

RESTREPO, A.; MONCADA, L. H. Indirect fluorescent antibody and quantitative agar gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Applied of Microbiology**, v. 24, p. 132-137, 1972.

RESTREPO, A.; SCHNEIDOU, J. D. Jr. Nature of the skin reactive principle in culture filtrates prepared from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 93, p. 1741-1748, 1967.

RIPPON, J.W. Paracoccidioidomycosis. In: **Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and The Pathogenic Actinomycetes**. 2^o ed, Canadá: W. B. Saunders, 1982.

ROBLES, A. M. **Estudios inmunológicos en pacientes con micosis sistêmicas**. Tese (Doutorado em medicina)- Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Argentina, 1983, 149p.

RODRIGUES, E. R.; LIRIO, V. S.; LACAZ, C. S. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 159-165, 1992.

SAN-BLAS, G.; MAIÑO, L.; SAN-BLAS, F.; APITZ-CASTRO, R. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 31, p. 133-141, 1993.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; APITZ-CASTRO, R. Ornithine decarboxylase in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives Microbiology**, v. 165, p. 311-316, 1996.

San-Blas, G., San-Blas, F. (1994). Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*. Dimorphism. In: Franco, M. F., Lacaz, C. S., Restrepo, A.; Del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. 1^o ed, Flórida: CRC Press, 49-66.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 225– 242, 2002.

SCHONBORN, C. X. The long-time survival of dermatophytes and moulds under paraffin oil. **Mycoses**, v. 39, p. 349-353, 2002.

SHERF, A. F. A method for maintaining *Phytomonas sepedonica* in culture for long periods without transfer. **Phytopatology**, v. 33, p. 330-332, 1943.

SILVA, A. M.; BORBA, C. M.; OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, v. 37, n. 5/6, p. 165-169, 1994.

SILVA, S. H. M.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H. S. L.; LOPES, J. D.; QUEIROZ-TELLES, F.; CAMARGO, Z. P. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3675-3680, 2003.

SILVA, S. H. M.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H. S. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; LOPES, J. D.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4680-4583, 2005.

SIQUEIRA, A. M. **Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E2 do *Paracoccidioides brasiliensis***. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982, 230p.

SIQUEIRA, A. M.; RODRIGUES, M. C. Técnicas micológicas e imunológicas. Técnicas de coloração em micologia. Micopatologia. Meios de cultivo. Preparação de antígenos micóticos. Métodos bioquímicos e imunoquímicos para o estudo de antígenos fúngicos. Prova de PCR. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARRI, E. M.; MELO, N. K. **Tratado de Micologia Médica**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, (2002), 1104 p.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The Preservation and Maintenance of Living Fungi**. 2º ed, Reino Unido: Cab International, 1994, 122 p.

TAMBUK, B. U.; PUCCIA, R.; ALMEIDA, M. L. C.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Secretion of the 43 KDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 26, p. 367-373, 1988.

TRAVASSOS, L. R. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*. Antigens. In: FRANCO, M. F.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. 1º ed, Flórida: CRC Press, 1994.

TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; CISSALPINO, P. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives Medical Respiratory**, v. 26, p. 297-304, 1995.

VIDAL, M. S. M.; BENARD, B.; BRITO, T.; DANTAS, K. C.; PEREIRA, C. N.; FRANÇA, F. A. S.; SILVA, A. M. G.; MARTINS, J. E. C. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 3014-3016, 2005.

YARZÁBAL, L.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J.; NAQUIRA, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, v. 15, p. 79-85, 1977.

YASUDA-SHIKANAI, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-319, 2006.

**APÊNDICE A - VIABILIDADE, MORFOLOGIA E TERMOCONVERSÃO
DE CULTURAS DE *PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS* ESTOCADAS
NA COLEÇÃO DE CULTURAS MICOTECA URM, RECIFE, BRASIL**

Artigo enviado para publicação:

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY
JOURNAL OF THE SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
São Paulo/Brasil

VIABILIDADE, MORFOLOGIA E TERMOCONVERSÃO DE CULTURAS DE *PARACOCIDIOIDES BRASILIENSIS* ESTOCADAS NA COLEÇÃO DE CULTURAS MICOTECA URM, RECIFE, BRASIL

Oliane Maria Correia Magalhães*¹; Rejane Pereira Neves¹; Cristina Maria de Souza Motta¹; Eliane Nogueira Barbosa da Silva¹; Kaliny Benício Torres¹; Lusinete Aciole de Queiroz¹

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

***Correspondência**

Rua Oliveira Fonseca, 350/101, Campo Grande, Recife-PE, Brasil. 52060-250

Fax: (+5581) 2126-8481 E-mail: olimicomed@yahoo.com.br

VIABILIDADE, MORFOLOGIA E TERMOCONVERSÃO DE CULTURAS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* ESTOCADAS NA COLEÇÃO DE CULTURAS MICOTECA URM, RECIFE, BRASIL

RESUMO

Vários métodos têm sido usados para preservação de culturas fúngicas, todos apresentam vantagens e desvantagens. Métodos para preservação com água destilada esterilizada e sob óleo mineral têm sido usados por várias coleções de culturas com diferentes resultados para cada espécie. Os objetivos deste estudo foram avaliar a viabilidade, morfologia e termoconversão de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM, Recife, Brasil. Foram reativadas seis amostras (2219, 2868, 3188, 3633, 3634, 3635) de *P. brasiliensis* preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral por um período que variou de 1968 a 1995. Após crescimento, foram verificadas pureza e morfologia. O processo do termodimorfismo M-Y foi realizado pelo subcultivo em caldo BHI e NGTA incubado a 37°C a 120 rpm. Os critérios adotados para a seleção das culturas fungicas visando à obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* baseou-se nos aspectos macroscópico das colônias bem como na termoconversão das células de *P. brasiliensis*. Das seis culturas mantidas em óleo mineral avaliadas, 83,3 % (2868, 3188, 3633, 3634, 3635) estavam viáveis. Os resultados dos experimentos com relação à viabilidade, padrão morfológico e processo dimórfico M-Y permitiram selecionar as amostras 3634 e 3635 de *P. brasiliensis* para produção e padronização de antígenos utilizados no imunodiagnóstico para paracoccidioidomicose.

Palavras chave: Água destilada esterilizada, óleo mineral, termoconversão, antígenos *Paracoccidioides brasiliensis*.

VIABILITY, MORPHOLOGY AND DIMORPHIC ABILITY OF STRAINS *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* STORED AT THE CULTURE COLLECTION MICOTECA URM, RECIFE, BRAZIL

ABSTRACT

Various methods have been used for preservation of fungi cultures, all them presenting advantage and disadvantage. Preservation methods with at sterile distilled water and under mineral oil been used by several at the culture collection with results different for each fungal species. The objectives of the present study were to evaluate the viability, morphology and thermoconversion of *P. brasiliensis* strains stored at the Culture Collection Micoteca URM, Recife, Brazil. Six (2219, 2868, 3188, 3633, 3634, 3635) *P. brasiliensis* strains preserved at sterile distilled water and under mineral oil were reactivated for period range 1968 to 1995 ears. After growth, were verified pure and morphology. The M-Y thermodimorphism process was realized by subculturing in BHI broth and NGTA incubated at 37°C in shaker 120 oscillations/min. The adopted criterion from selection of the fungi cultures aiming at antigen production was based in observation macroscopic of the colonies as well as in the cells thermoconversion from *P. brasiliensis*. Of the evaluated six cultures preserved under mineral oil, 83,3% (2868, 3188, 3633, 3634, 3635) were viable during 39, 19 and 10 years; none of the strains maintained in distilled sterilized water were viable. The results experiment carried out here to evaluate the viability, morphological patterns and dimorphic process permitted to select *P. brasiliensis* 3634 and 3635 strains to production and padronization antigens used in immunodiagnostic for paracoccidioidomycosis.

Key words: Sterile distilled water, mineral oil, thermoconvention, antigen, *Paracoccidioides brasiliensis*.

INTRODUÇÃO

Vários métodos têm sido descritos para preservação de culturas de fungos, todos apresentam vantagens e desvantagens. A escolha do método de preservação depende da disponibilidade da coleção de culturas, tempo de preservação, estabilidade genética, características fenotípicas das culturas e de outros fatores (2,8,15).

A Coleção de Culturas Micoteca URM Recife, Brasil, mantém culturas preservadas em duplicata em água destilada esterilizada (3), sob óleo mineral (12) e liofilização (9).

A preservação de culturas de fungos patogênicos ao homem, como *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore, 1912) Almeida, 1930, fungo termodimórfico agente etiológico da paracoccidioidomicose, é importante para pesquisa e biotecnologia. Assim, a escolha correta do método de preservação para cada espécie, monitoramento periódico para verificação da morfologia, patogenicidade e estabilidade genética, e outros estudos são necessários para o entendimento dos problemas relacionados às condições de estoque, a fim de ser selecionado o melhor método de preservação para cada espécie (6,7).

Os objetivos deste estudo foram avaliar a viabilidade, morfologia e processo de termodimorfismo de culturas de *P. brasiliensis* preservadas em água esterilizada e sob óleo mineral estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM, Recife, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram reativadas seis culturas de *P. brasiliensis* isoladas de espécimen clínicos preservadas em duplicata em água esterilizada e sob óleo mineral estocadas a 25°C na Coleção de Culturas Micoteca URM por um período que variou de 1968 a 1995 (Tabela 1). Fragmentos de culturas preservadas em água foram transferidos para a superfície dos meios ágar Sabouraud (Difco) e ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco) contidos em tubos de ensaio e em placas de Petri; das culturas preservadas sob óleo, os fragmentos foram transferidos para caldo glicosado contido em tubos de ensaio, mantidos a temperatura ambiente por 90 dias. Após crescimento, as amostras foram transferidas para ágar Sabouraud e ágar BHI a fim de verificar pureza e características morfológicas.

O processo do termodimorfismo M-Y foi realizado por subcultivos em caldo BHI e NGTA (neopeptona, glicose, tiamina e asparagina) incubados a 37°C a 120 rpm e as

subculturas foram realizadas a cada sete dias para obter a fase leveduriforme. Os subcultivos foram realizados cinco vezes e as células preparadas com azul de Amann (6) e monitorizadas ao microscópico de luz Zeiss. Os critérios adotados para seleção das culturas fúngicas visando à obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* baseou-se nos aspectos macroscópicos das colônias bem como na termoconversão das células de *P. brasiliensis*. Após produção, preparações de exoantígenos brutos foram avaliadas por SDS-PAGE e padronizados com os testes sorológicos de imunodifusão dupla (ID) e contraímunoeletroforese (CIE) usados no imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De seis culturas preservadas sob óleo mineral, 83,3 % (2868, 3188, 3633, 3634, 3635) estavam viáveis durante 19 e 10 anos; nenhuma amostra mantida em água destilada esterilizada estava viável (Tabela 2). Os resultados demonstram que a amostra de *P. brasiliensis* 2219 estavam inviáveis nos dois métodos, possivelmente devido ao período de 37 anos de preservação da cultura original estocada em 1968 sendo subcultivada em 1986 e mantida na Coleção de Culturas Micoteca URM por 19 anos (Tabela 2).

No método de preservação em água destilada esterilizada proposta por Castelanni (3), inicialmente para manutenção de fungos de interesse médico, não foi constatada viabilidade em nenhuma das seis culturas de *P. brasiliensis* estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM. Os resultados obtidos demonstram que culturas de *P. brasiliensis* preservados em água destilada esterilizada em coleções de culturas requer monitoramento periódico nos subcultivos, esses dados estão corroborados por Rodrigues *et al.* (11) que estudando durante dois anos cinco culturas, verificaram que a viabilidade diminui com o tempo; esses autores indicam a grande importância no controle dos subcultivos de *P. brasiliensis* preservados por este método.

De acordo com outros autores o método de Castellani (3) é simples e economicamente viável para coleções de culturas de pequeno tamanho com bons resultados; contudo em maiores coleções de culturas, é necessário menor tempo de subcultivo, escolha do tempo exato de intervenção para induzir crescimento e desenvolvimento restrito de cada amostra, são fatores essenciais para o sucesso da preservação (2,8,11).

Os resultados de viabilidade obtidos com amostras de *P. brasiliensis* preservados sob óleo mineral, por um período que variou de 19 e 10 anos, foram superiores (83,3%) aos de

Silva *et al.* (14) que obtiveram viabilidade de 26% com culturas estocadas de nove a dez anos na Coleção de Cultura da Fundação Oswaldo Cruz. Nossos resultados estão de acordo com Lacaz *et al.* (5), que afirmam a longevidade deste fungo capaz de crescer bem à temperatura ambiente por longo tempo. Por outro lado Lima and Borba (6) trabalhando com amostras de fungos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* verificaram diminuição da viabilidade e melhores resultados com *Sporothrix schenckii*.

Várias Coleções de Culturas preservam *P. brasiliensis* pelos métodos de Castellani (3) e de Sherf (12) ou raramente pelo método de Raper e Alexander (9). Nos Laboratórios de Micologia Médica, as culturas são mantidas por repiques sucessivos a cada três meses (5).

A sobrevivência de culturas de *P. brasiliensis*, estocadas em coleções de culturas pode ser afetada pelo tempo prolongado de preservação (7,11). Figueredo (4) considera que esse método pode ser melhorado pela substituição da água destilada por solução fisiológica salina para equilibrar a pressão osmótica.

As culturas 3634 e 3635 na fase micelial a 25°C apresentaram colônias cotonosa, com alguns tufo de micélio aéreo e superfície algodonosa variando de branca a bege, mostrando fissuras e filamentos finos com conídios, nenhuma das quais é características de *P. brasiliensis*. Por outro lado à obtenção da fase leveduriforme ocorreu após vários subcultivos, mostrando colônias de cor creme, cerebriforme como levedura e células com parede dupla, birrefringente e brotamento múltiplo de *P. brasiliensis* (Figura 1).

As amostras 2868, 3188 e 3633 cresceram a 25°C apresentando colônias cerebriiformes (Figura 1) produzindo macromicromorfologia transitória tornando-se incapaz de completar o processo dimórfico, provavelmente pelo tempo de estoque 19, 15 e 10 anos respectivamente.

Termoconversão M-Y é previamente estabelecida, porém podem falhar em culturas preservadas por longo tempo provavelmente pela baixa concentração de oxigênio e presença de metabólitos tóxicos acumulados sob o óleo (1,6,7).

Os padrões morfológicos atípicos apresentados pelas amostras, e a perda da habilidade dimórfica estão de acordo com Borba *et al.* (1), Lima *et al.* (7), Rodrigues *et al.* (11), Silva *et al.* (14).

As estruturas fúngicas evidenciadas a partir da termoconversão demonstraram que as referidas culturas depositadas na Coleção de Culturas Micoteca URM são compatíveis às descritas por (5,10,13) como *P. brasiliensis*.

Os componentes dos exoantígenos brutos de *P. brasiliensis* foram analisados por SDS-PAGE e após coloração com prata, foram observadas frações protéicas, incluindo o componente gp43 o principal antígeno de *P. brasiliensis* usado para diagnóstico.

Os testes de ID e CIE foram positivos com soros de 10 pacientes com paracoccidioidomicose ativa; soros de pacientes com histoplasmoses, aspergilose e indivíduos saudáveis como controles não reagiram.

Os testes revelaram que os antígenos forneceram especificidade de 100% em todos os soros testados os quais foram positivos para com paracoccidioidomicose ativa, enquanto soros de pacientes com histoplasmoses, aspergilose e controles saudáveis não reagiram.

Os experimentos realizados para avaliar a viabilidade, padrão morfológico e processo dimórfico (M-Y) permitiram selecionar as amostras de *P. brasiliensis* 3634 e 3635 para produção e padronização de antígenos usados no imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq (Process N° 021/2005).

REFERÊNCIAS

1. Borba, C.M.; Vinhas, E.A.; Lopes-Bezerra, L.M.; Lucena-Sila, N. (2005). Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 88(3-4), 257-266.
2. Bueno, L.; Gallardo, T. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada esterilizada. *Rev. Iberoam. Med.*, 15, 166-168.
3. Castellani, A. (1967). Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. Tro. Med. Hyg.*, 70, 181-184.
4. Figueredo, M.B. (2001). Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*, 63 (1-2), 73-82.
5. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vacarri, E.M.; Melo, N.K. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier, São Paulo, 1104p.
6. Lima, R.F.; Borba, C.M. (2001). Viability and morphological characteristics and dimorphic ability by different methods. *Rev. Iberoam. Med.*, 18, 191-196.
7. Lima, R.F.; Santos, B.M.M.; Schffer, G.G., Lima, O.C.; Borba, C.M. (2004). Evaluation of the in vitro and in vivo dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and

Paracoccidioides brasiliensis isolates after preservation in mineral oil. *Can. J. Microbiol.*, 50, 445-449.

8. Panizzo, M.M.; Reviàkina, V.; Williams, .M.; González, G. (2005). .Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 25(1), 37-48.

9. Raper; K.B.; Alexander, D.F. (1945). Preservation of molds by lyophil process. *Mycologia*, 37, 499-525.

10. Rippon, J.W. (1982). *Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Saunders Company, Philadelphia, 842p.

11. Rodrigues, E.R.; Lirio, V.S.; Lacaz, C.S. (1992). Preservação de Fungos e Actinomicetos de Interesse Médico em Água Destilada. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*. 34(2), 159-165.

12. Sherf, A.F. (1943). A method for maintaining *Phytophthora septentrionalis* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology*, 33, 330-332.

13. Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. (2004). *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 388p.

14. Silva, A.M.; Borba, C.M.; Oliveira, P.C. (1994). Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. *Mycoses*, 37 (5-6), 165-169.

15. Smith, D.; Onions, A.H.S. (1994). *The preservation and maintenance of living fungi*. CAB International, UK, 122p.

Tabela 1. Culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM Recife, Brasil.

Nº da amostra	Substrato	Métodos de preservação	Ano de preservação
1	Esputo	ADE/ÓM	1968 1986*
3	Esputo	ADE/ÓM	1986
3	Esputo	ADE/ÓM	1990
3	Esputo	ADE/ÓM	1995 2001*
4	Esputo	ADE/ÓM	1995 2001*
5	Esputo	ADE/ÓM	1995 2001*

ADE = Água Destilada Esterilizada; ÓM = Óleo Mineral; * = Ano de Reativação

Tabela 2. Teste de viabilidade de culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* estocadas Coleção de Culturas Micoteca URM Recife, Brasil.

Nº da amostra	Ano de Preservação	Métodos de preservação	
		ADE	OM
)	1968	-	-
	1986*	-	+
}	1986	-	+
}	1990	-	+
}	1995	-	+
	2001*	-	+
†	1995	-	+
	2001*	-	+
;	1995	-	+
	2001*	-	+

ADE = Água Destilada Esterilizada; OM = Óleo Mineral; * = Ano de Reativação;
 - = Cultura Inviável; + = Cultura Viável.

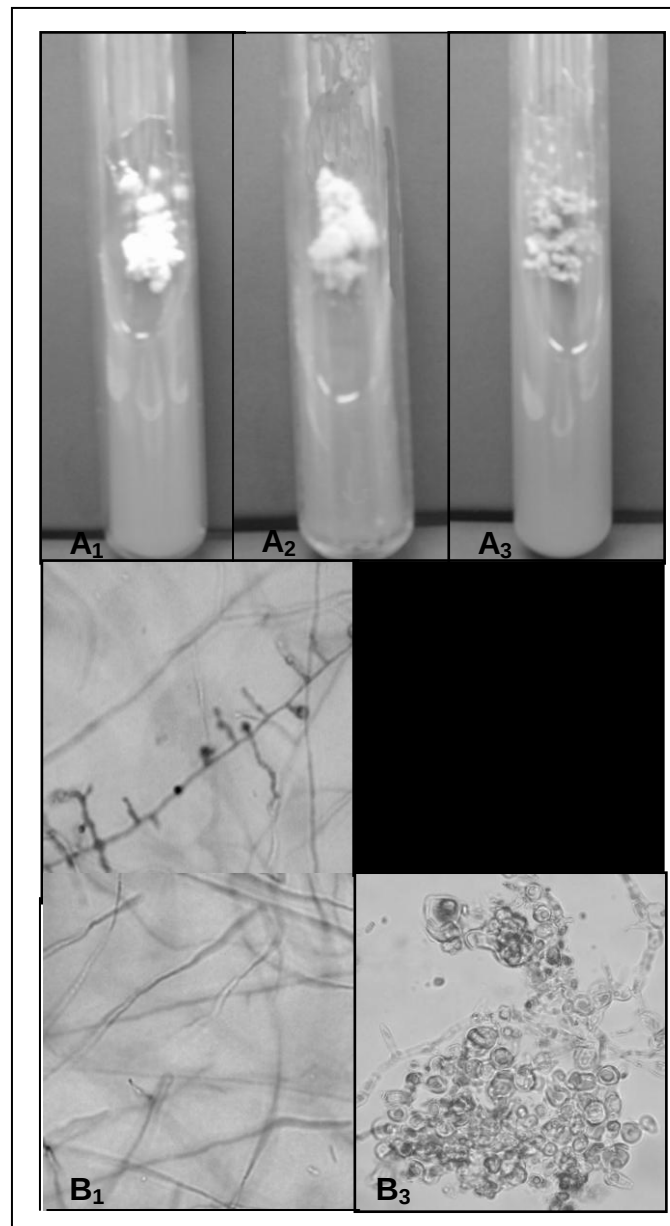


Figura 1. Características Macro-micromorfológica (A e B) de amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* typical at 25°C (A₁, B₁) and 37°C (A₂, B₂) and atypical at 25°C (A₃, B₃) in Brain Heart Infusion.

**APÊNDICE B - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES
SOROLÓGICOS DE IMUNODIFUSÃO DUPLA E ONTRAIMUNOELETROFORESE
NO DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Artigo enviado para publicação:

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY
JOURNAL OF THE SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
São Paulo/Brasil

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES SOROLÓGICOS DE IMUNODIFUSÃO DUPLA E CONTRAIMUNOELETOFORESE NO DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Oliane Maria Correia Magalhães^{*1}; Rejane Pereira Neves¹; Lusinete Aciole de Queiroz¹; Maria da Conceição Gomes Leitão², Maria José Mendes-Giannini³

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco.

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

***Correspondência**

Rua Oliveira Fonseca, 350/101, Campo Grande, Recife-PE, Brasil. 52060-250

Fax: (+5581) 2126-8480 E-mail: olimicomed@yahoo.com.br

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS TESTES SOROLÓGICOS DE IMUNODIFUSÃO DUPLA E CONTRAIMUNOELETROFORESE NO DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

RESUMO

O fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM) micose sistêmica crônica granulomatosa prevalente em zonas rurais da América Latina. Os testes sorológicos empregados no diagnóstico e controle de cura têm sido avaliados de acordo com a sensibilidade e especificidade. Neste estudo, foi verificadas a produção e padronização de antígenos de *P. brasiliensis* preservados em água destilada esterilizada e sob óleo mineral e de uma cultura selvagem. Antígenos de filtrados de culturas de três culturas de *P. brasiliensis* (3634, 3635, 5378) na fase leveduriforme foi cultivado em meio NGTA e incubados a 37°C sob agitação a 120 rpm por 15 dias. Após produção, foi determinado o conteúdo de proteínas e as preparações de antígenos foram padronizadas através das técnicas sorológicas de imunodifusão dupla (ID) e contraímuno eletroforese (CIE). Os testes de ID com os três antígenos foram positivos com 37 (86,0%) soros de 43 pacientes com paracoccidioidomicose ativa; o teste de CIE foi positivo com 42 soros (98,0%) de 43 pacientes portadores de paracoccidioidomicose e expressaram também 100% de especificidade. Análise dos resultados sugere o grande valor dos testes de ID e CIE no sorodiagnóstico da paracoccidioidomicose ativa. Ambos os testes mostraram alto grau de sensibilidade e especificidade, sendo CIE ligeiramente superior a ID.

Palavras chave: Paracoccidioidomicose, antígenos, imunodifusão dupla, contraímuno eletroforese.

THE SENSITIVITY AND SPECIFICIT OF SEROLOGICAL TESTS OF DOUBLE IMMUNODIFFUSION AND COUNTERIMMUNOELECTROPHORESIS IN THE DIAGNOSIS OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

ABSTRACT

The thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), is a chronic granulomatous systemic mycosis prevalent in rural zones of Latin America. The tests serological employed in the serodiagnosis and cure controls have been evaluated according to their sensitivity and specificity. In this study, was verified production and patterning of antigen *P. brasiliensis* preserved at sterile distilled water and under mineral oil and one wild culture. Culture filtrate antigens of three *P. brasiliensis* yeast cells (3634, 3635, 5378) were culture in NGTA medium and incubated in gyratory shaker at 120 rpm for 15 days at 37°C. After production, the protein content was determined and antigens preparations were standardized by double immunodiffusion (ID) and counterimmunoelectrophoresis (CIE). The ID tests with the three antigens were positive in 36 (86,0%) sera of the 43 patients with active paracoccidioidomycosis; the CIE tests were positive in 42 (98,0%) sera of the 43 patients with paracoccidioidomycosis and it was also 100% specific. Analysis of the results suggests the great value of the ID and CIE tests in the serodiagnosis of active paracoccidioidomycosis. Both tests showed high degree sensibility and specificity, CIE being slightly superior to ID.

Key words: Paracoccidioidomycosis, antigens, double immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis.

INTRODUÇÃO

O fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore, 1912) Almeida 1930 é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica crônica granulomatosa prevalente em zonas rurais da América Latina, cujas áreas de endemicidade se estende da Argentina à América Central, com alta incidência no Brasil, tem sido uma das mais prevalentes micoses profundas dessa região (14,22,23).

A doença é adquirida quando propágulos do fungo na fase miceliana são inalados através da via respiratória, converte-se à fase leveduriforme e então pode se disseminar por via sangüínea e ou linfática a todas as partes do corpo (6).

Esta micose apresenta múltiplas manifestações clínicas, é rotineiramente diagnosticada pela detecção microscópica de células leveduriformes em espécimens clínicos e pela observação da cultura (2) e por testes sorológicos usados como uma ferramenta no diagnóstico (1,3,25).

Os testes sorológicos empregados no diagnóstico e controle de cura têm sido avaliados de acordo com a eficiência baseada na sensibilidade e especificidade. Frequentemente são usados no mínimo dois métodos, imunodifusão (ID) e contraímuno eletroforese (CIE) recomendados para fazer o diagnóstico sorológico (7,9,20). Isolados de *P. brasiliensis* variam quanto à curva de crescimento, características ultra-estruturais, composição de antígeno e molecular indicando que PCM pode ser causada por diferentes amostras do fungo (6).

Pacientes com PCM não mostram deficiência na produção de anticorpos, mas a hiperatividade da resposta imune humoral, os quais resultam em altos títulos de anticorpos e hipergamaglobulina (6).

Nenhum teste diagnóstico é superior ao isolamento ou à inconfundível identificação do agente causal em espécimes clínicos relevantes e ou na histopatologia invadindo o tecido. Contudo, essas situações ideais não são sempre possíveis, portanto frequentemente devem ser empregadas abordagens diagnósticas que são baseadas nos testes sorológicos (6).

Os objetivos deste trabalho foram verificar a produção e padronização de antígenos de isolados de *P. brasiliensis* estocados na Coleção de Culturas Micoteca URM, Recife, Brasil e de uma cultura selvagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de soros

As amostras de soros foram adquiridas do banco de soros (Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara e do Centro Especializado em Micologia Médica, UFC, Ceará) obtidas de pacientes com prévio diagnóstico de PCM, histoplasmose e aspergilose, de acordo com o método de diagnóstico padronizado de exame direto, isolamento em cultura e testes sorológicos positivos. Esses soros foram primeiramente aliquotizados e estocados a -20°C, para obter reprodutividade dos resultados.

Um total of 61 amostras de soros foram examinados, 43 de pacientes com PCM, seis com histoplasmose, seis com aspergilose e seis indivíduos controles sadios.

Culturas de *P. brasiliensis*

Foram reativadas seis culturas de *P. brasiliensis* (2219, 2868, 3188, 3633, 3634, 3635) mantidas a 25°C e preservadas em duplicata à temperatura ambiente em água destilada esterilizada e sob óleo mineral, estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM por um período que variou de 1968 a 1995, e uma cultura selvagem isolada de esputo e depositada na referida coleção sob o número 5378 URM.

Fragmentos de culturas preservados em água foram transferidos para a superfície dos meios ágar Sabouraud (Difco) e ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco) contidos em tubos de ensaio e placas de Petri; as culturas preservadas sob óleo, os fragmentos foram transferidos para caldo glicosado contido em tubos de ensaio, mantidos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por até 90 dias. Após crescimento, as amostras foram transferidas para ágar Sabouraud e ágar BHI a fim de verificar pureza e características morfológicas.

O processo do termodimorfismo M-Y foi realizado por subcultivos em caldo BHI e NGTA (neopeptone 1,6%; glicose 1%; tiamina 0,01% e asparagina 0,02%) incubados a 37°C a 120 rpm e as subculturas foram realizadas a cada sete dias até obter a fase leveduriforme. Foram realizados cinco subcultivos com as culturas estocadas e dois com a cultura selvagem; as células foram examinadas com azul de Amann (15) e monitorizadas ao microscópico de luz modelo Zeiss. Os critérios adotados para seleção de culturas de fungos objetivando a

produção de antígeno foi baseado na observação macroscópicas das colônias bem como na termoconversão com células multibrotantes de *P. brasiliensis*.

Produção de exoantígenos

A produção de exoantígenos foi de acordo com Negroni (18), baseado na técnica de Evans e Kessel (8) modificada por Siqueira (27).

Antígenos de filtrados de culturas (AgPb) de três isolados de *P. brasiliensis* 3634, 3635 e 5378 foram preparados de células na fase leveduriforme cultivadas em 100 mL do meio NGTA contido em frascos Erlenmeyer de 500mL e incubadas a 37°C sob agitação a 120 rpm por sete dias. Após este período, o conteúdo de 100 mL foi transferido para 500 mL de NGTA contido em frasco Erlenmeyer de 1000 mL e incubado a 37°C sob agitação a 120 rpm por 15 dias. As células foram atenuadas com timerosal (0,2 g/L), separadas por filtração a vácuo usando papel de filtro (Reagen, RJ, Brazil) e posteriormente filtradas através de membrana Millipore de 0,22µm. Em seguida, o volume do filtrado foi concentrado em 10 a 20 vezes o volume e dialisado durante 48 horas com água destilada.

Foram produzidos três lotes de cada antígeno. O mesmo lote de cada antígeno foi usado durante o estudo na concentração de 20 vezes o volume e não diluído. Após produção, as preparações antigênicas foram padronizadas por técnicas sorológicas e químicas, posteriormente, divididos em pequenos volumes e estocados a -20°C até o uso.

A padronização imunológica foi realizada através das técnicas sorológicas de ID e CIE; a padronização química foi determinada à concentração de proteínas pelo método de Bradford (5).

Padronização imunológica de antígenos

Nos procedimentos de padronização imunológica são usualmente recomendadas duas técnicas sorológicas como ID e CIE de acordo com Siqueira e Rodrigues in Lacaz *et al.* (14).

O antígeno foi usado não diluído e diluído 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 para ID e CIE, contra soro positivo. O título do antígeno foi determinado de acordo com a mais alta diluição do soro com positividade nítida e o mesmo número de bandas de precipitação comparado ao antígeno padrão adquirido da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara. Por outro lado, na padronização cruzada, antígenos e soros foram usados diluídos em proporções

iguais 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16. A melhor diluição do antígeno foi determinada de acordo com o mais alto título do soro reagente sendo usado de dois soros controle positivos.

Padronização química de antígenos

Para padronização química dos antígenos produzidos para imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, foi determinada a concentração de proteínas pelo método de Bradford (5) segundo Camargo e Scaletsky (2002 apud LACAZ *et al*, 2002).

Provas sorológicas

Imunodifusão dupla (ID) foi realizada em lâminas de vidro (75x25mm) revestidas com 1 mL de ágar purificado (Difco) a 1% em água destilada, secas e posteriormente recobertas com 3 mL do gel composto de ágar purificado (Difco) a 1% em solução fisiológica contendo 0,4% de citrato de sódio e 0,01% de timerosal. O poço central foi preenchido com 10µl do antígeno e os poços periféricos com 10µl de soro de referência e soros de pacientes testes. As lâminas foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente ($TA = 28 \pm 2^{\circ}C$) por 48 horas. Posteriormente, as mesmas foram lavadas em salina, secadas e coradas com solução a 0,4% de azul de Coomassie (Sigma) e descorada com uma solução de ácido acético glacial a 5%.

Contraímunoeletroforese (CIE) foi conduzida em lâminas de vidro (75x25mm) revestidas com 1 mL de ágar purificado (Difco) a 1% em água destilada, secadas e posteriormente recoberta com 3 mL de gel composto de agarose a 1% em tampão veronal pH 8.2. Os poços do lado anódico da lâmina foram preenchidos com 10µl dos soros de referência e soros testes e os poços do lado catódico foram preenchidos com 10µl do antígeno. As lâminas foram submetidas à eletroforese contendo tampão veronal pH 8.2 e corrente de 6 mA por lâmina durante 90 minutos. Os procedimentos de lavar, secar e corar as lâminas foram os mesmos usados na ID.

Os resultados de ambos os testes foram considerados positivos quando uma ou mais bandas foram detectadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da termoconversão, a amostra 5378 apresentou habilidade de conversão da fase M-Y no segundo subcultivo, e às culturas 3634 e 3635 após o quinto subcultivo; as amostras 2868, 3188, 3633 apresentaram morfologia transitória e a cultura 2219 estava inviável.

De acordo com os critérios adotados para a produção de antígenos foram selecionadas as culturas *P. brasiliensis* URM 3634 e 3635 e uma cultura 5378 selvagem.

Os resultados da termoconversão M-Y são previamente estabelecidos, porém podem falhar em culturas preservadas por longo tempo, provavelmente pela baixa concentração de oxigênio e presença de metabólitos tóxicos acumulados sob o óleo (4,15,16).

A concentração de proteínas foi de 541µg/mL, 658µg/mL e 808µg/mL e o título dos antígenos produzidos foi de 1/4, 1/8 e 1/32 das culturas 3634, 3635 e 5378 respectivamente.

Os testes de ID com os três antígenos foram positivos em 37 (86,0%) soros de 43 pacientes com paracoccidioidomicose ativa incluído nesse estudo. Soros de seis pacientes com histoplasmose, seis com aspergilose e seis de doadores sadios não reagiram, indicando 100% de especificidade dos antígenos de *P. brasiliensis*.

Os resultados de soros de 37 pacientes que reagiram através da ID com os antígenos de *P. brasiliensis* produzidos com as culturas 3634 e 3635, foram obtidos com soros totais e com títulos de anticorpos de até 1/32; por outro lado o antígeno obtido com a cultura 5378 reagiu com soros totais e com títulos de anticorpos de até 1/128.

Os testes de CIE com os três antígenos foram positivos com 42 (98,0%), soros de 43 pacientes portadores de paracoccidioidomicose e expressaram também 100% de especificidade.

Os resultados de 42 soros que reagiram através da CIE com os antígenos de *P. brasiliensis* das culturas 3634 e 3635 reagiram com soros totais e com títulos de anticorpos de até 1/64; enquanto o antígeno obtido com a cultura 5378 reagiu com soros totais e com até 1/512.

O longo período de estoque das culturas de *P. brasiliensis* 3634 e 3635 mantidas sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM desde 1995 podem ter contribuído para menor sensibilidade comparando com a amostra 5378.

De acordo com Kurokawa *et al.* (13) e Stevens *et al.* (28) a adaptação de células fúngicas a métodos de estocagem com redução da atividade metabólica, pode envolver

regulação de genes que de alguma maneira pode afetar a expressão de determinantes de virulência.

A sensibilidade de 86,0% e alta especificidade de 100% constatadas com ID, também foram relatadas por outros autores, com sensibilidade variando de 65% a 100% dependendo do tipo de antígeno usado, os quais concluíram que este teste sorológico é uma importante ferramenta no diagnóstico da PCM (9,10,12,17,19,21).

Neste trabalho foram obtidos resultados falso negativos com os soros de seis (14,0%) pacientes com o teste de ID e um (2%) com CIE. Os resultados confirmam a importância do uso de no mínimo dois métodos para diagnóstico sorológico. Outros autores relatam resultados falso negativos com soro de pacientes com PCM ativa (9,10,12,19).

A análise dos resultados sugere o grande valor dos testes de ID e CIE no sorodiagnóstico de PCM ativa. Ambos os testes mostraram alto grau de sensibilidade e especificidade, sendo CIE ligeiramente superior a ID.

Neves *et al.* (19) afirmam que resultados sorológicos negativos podem ser observados até mesmo quando células de *P. brasiliensis* são encontradas em materiais biológicos; esses casos podem ser relacionados à baixa avidéz de anticorpos imunoglobulina G2 guiada contra epítomos de carboidratos.

Os resultados, obtidos com testes de ID e CIE, mostraram alto grau de sensibilidade e especificidade de 100% com todos os soros testados de pacientes com PCM ativa. O teste de CIE é considerado com sensibilidade entre 77% e 97% e especificidade de no mínimo 95,0%; é considerada a sensibilidade igual ou ligeiramente superior à fornecida pela ID (9,10,12,17,21).

Os resultados com ID e CIE foram também observados por Del Negro *et al.* (9) ao verificarem no teste de ID positividade em 42 (91,3%) de 46 pacientes com PCM ativa e 100% de especificidade; os testes com CIE foi 95,6% e teve também 100% de especificidade; ambos os testes mostraram alta eficiência, sendo CIE ligeiramente superior à ID. De acordo com Del Negro *et al.* (11) ID foi positivo em 95,3% com soro de 43 pacientes incluídos no estudo e de todos os pacientes os resultados foram positivos com teste de CIE. Silva *et al.* (26) com o teste de ID constataram resultados positivos em cinco (45,5%) soros de 11 pacientes com neuroparacoccidioidomicose, com títulos de anticorpos variando de 1/4 e 1/16 para duas amostras desses soros.

A detecção de anticorpos específicos pode ser útil no diagnóstico da PCM, bem como no monitoramento da evolução da doença e resposta ao tratamento (24). Associação entre

severidade da doença e resposta alta de anticorpos pode ser importante na avaliação do prognóstico do paciente e seguimento do tratamento (11).

Os autores sugerem que os laboratórios de micologia médica devam dar prioridade aos testes de precipitação em gel de ágar e agarose no imunodiagnóstico da PCM (9).

Até o momento, grandes avanços têm sido reportado na imunopatologia de micoses. Diagnóstico baseado na detecção de anticorpos é útil no diagnóstico de micoses sistêmicas principalmente PCM e sua sensibilidade e especificidade depende tanto do antígeno quanto do teste usado (6).

Yasuda-Shikanai *et al.* (29) concluíram que ID representa vantagens sendo a melhor opção pela simplicidade do teste, baixo custo, sensibilidade superior a 80% e especificidade de 90% e a experiência acumulada recomenda este teste para diagnóstico sorológico da PCM.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao RENNEBRA-CNPq (Process N° 021/2005) pelo apoio financeiro e a Dra. Maria José Mendes-Giannini, Dr. Júlio Sidrim e Dra. Rossana Aguiar pelo fornecimento dos soros.

REFERÊNCIAS

1. Almeida, S.M., Queiroz-Telles, F.; Doi, E. M.; Ono, M; Werneck, L.C. (2002). Anti-gp43 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 118, 864-868.
2. Bialek, R.; Ibricevic, A.; Aepinus, C.; Najvar L.K.; Fothergill, A.W.; Knobloch, J.; Graybill, J.R. (2000). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in Tissue samples by a Nested PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2940–2942.
3. Blotta, M.H.S.L.; Mamoni, R.L.; Oliveira, S.J.; Novér, A.S.; Papaiordamon, P.M.O.; Gouveia, A.; Camargo, Z.P. (1999). Paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in southeast region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61, 390-394.
4. Borba, C.M.; Vinas, E.A.; Lopes-Bezerra, L.M.; Lucena-Sila, N. (2005). Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 88(3-4), 257-266.

5. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
6. Camargo, Z.P.; Franco, M.F. (2000). Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17, 41-48.
7. Camargo, Z.P.; Berzaghi, R.; Amaral, C.C.; Marques da Silva, S.H. (2003). Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med. Mycol.*, 41, 539-542.
8. Evans, E.E.; Kessel, J.P. (1951). The composition of *Cryptococcus neoformans*. II: Serologic studies with the capsular polysaccharide. *J. Immunol.*, 67, 109-114.
9. Del Negro, G.M.B.; Garcia, N.M.; Rodríguez, E.G.; Cano, M.S.N.; Aguiar, M.S.M.V.; Lírio, V.S.; Lacaz, C.S. (1991). The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. São Paulo.*, 33(4), 377-280.
10. Del Negro, G.M.B., Benard, G.; Assis, C. M.; Vidal, M.S.M.; Garcia, N.M.; Otani, C.; Shikanai-Yasyda, M.A.; Lacaz, C.S. (1995). Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *J. Med. Vet. Mycol.*, 33, 11–116.
11. Del Negro, G.M.B.; Pereira, C.N.; Andrade, H.F.; Palacios, S.A.; Vidal, M. M.S.; Charbel, C.E.; Benard, G. (2000). Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Microbiol.*, 49, 37–46.
12. Do Valle, A.C.R.L.; Costa, P.C.; Fialho, M.; Von Helder, J.; Muniz, M.M.; , Zancopé-Oliveira, R.M. (2001). Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.*, 39, 373–377.
13. Kurokawa, C.S.; Lopes, C.R.; Sugizaki, M.F.; Kuramae, E.E.; Franco, M.F.; Peraçoli, M. T.S.(2005).Virulence profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. Association with morphologic and genetic patterns. *Rev. Inst. Med. Trop. São. Paulo.*, 47(5), 257-262.
14. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vacarri, E.M.; Melo, N.K. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier, São Paulo, 1104p.
15. Lima, R.F.; Borba, C.M. (2001). Viability and morphological characteristics and dimorphic ability by different methods. *Rev. Iberoam. Med.*, 18, 191-196.
16. Lima, R.F.; Santos, B.M.M.; Schffer, G.G., Lima, O.C.; Borba, C.M. (2004). Evaluation of the in vitro and in vivo dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and

Paracoccidioides brasiliensis isolates after preservation in mineral oil. *Can. J. Microbiol.*, 50, 445-449.

17. Mendes-Giannini, M.J.S; Del Negro, G.M.; Siqueira, A.M. (1994). Serodiagnosis. In Franco, M.F.; Lacaz, C.S.; Restrepo, A.; Del Negro, G.(Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Fla, CRC Press, p.345-363.

18. Negroni, R.; Negroni, P. (1968). Antigenos del *Paracoccidioides brasiliensis* para las reacciones serologicas. *Mycopathologia*, 34(3-4), 285-288.

19. Neves, A.R.; Rossi, R.L.C.L.; Camargo, Z.P.; Blotta, M.H.S.L. (2003). Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5, 802–807.

20. Restrepo, A. (1992). Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. *ISHAM Myc Newsletter* 59:4.

21. Restrepo, A.; Cano, L.E.; Ochoa, M.T. (1984). A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. *J. Med. Vet. Mycol.*, 22, 23-29.

22. Restrepo, A.; Tobo'n, A.M. (2005). *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell, G.; Bennett, J.E, Dollin, R.(eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier, Philadelphia, New York, p. 3062–3068.

23. San-Blas, G.; Niño-Vega, G.; Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.*, 40 (3), 225 – 242.

24. Sandhu, G.S.; Aleff, R.A.; Kline, B.C.; Lacaz, C.S. (1997). Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1894-1896.

25. Silva, S.H.M.; Colombo, A.L.; Blotta, M.H.S.L.; Lopes, J.D.; Queiroz-Telles, F.; Camargo, Z.P. (2003). Detection of Circulating gp43 Antigen in Serum, Cerebrospinal Fluid, and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (8), 3675-3680.

26. Silva, S.H.M.; Colombo, A.L.; Blotta, M.H.S.L.; Queiroz-Telles, F.; Lopes, J.D.; Camargo, Z.P. (2005). Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 43 (9), 4680-4583.

27. Siqueira, A.M. (1982). *Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E2 do Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, Brasil, 220p. (DO, These. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

28. Stevens, D.A., Brummer, E., Disalvo, A.F.; Ganer, A. (1997). Virulent isolates and mutants of *Blastomyces* in mice: a legacy for studies of pathogenesis. *Semin. Respir. Infect.*, 12, 189-195.
29. Yasuda-Shikanai, M.A.; Telles Filho, F.Q.; Mendes, R.P.; Colombo, A.L.; Moretti, M.L. (2006). Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39 (3), 297-319.

**APÊNDICE C - IMPORTÂNCIA DO IMUNOBLOT NO DIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Artigo a ser enviado para publicação:

MYCOPATHOLOGY

The Netherlands

Importância da imunoblot no diagnóstico da paracoccidioidomicose

Oliane Maria Correia Magalhães*¹; Lusinete Acirole de Queiroz¹; Maria da Conceição Gomes Leitão², Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque², Maria José Mendes-Giannini³

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco.

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Financial support: ao CNPq- RENNEBRA (Process N° 021/2005).

*Corresponding author: olimicomed@yahoo.com.br

Rua Oliveira Fonseca, 350/101, Campo Grande, Recife-PE, Brasil. 52060-250

Fax: (+5581) 2126-8480

Importância da imunoblot no diagnóstico da paracoccidioidomicose

RESUMO

Paracoccidioidomicose é uma doença causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*; afeta principalmente os pulmões de onde se dissemina a outros órgãos produzindo injúrias secundárias e na ausência de terapia efetiva progride e pode ser fatal. A importância de um diagnóstico preciso e rápido desta micose reside em promover terapia, evitando aumento de dano pulmonar, disseminação e o desenvolvimento de fibrose. Vários métodos têm sido usados no diagnóstico da paracoccidioidomicose, os quais podem ser microbiológicos e imunológicos. Neste trabalho, foi analisada a importância da técnica de imunoblot para diagnóstico da paracoccidioidomicose com antígenos de filtrado de culturas de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme cultivada em meio contendo neopeptona, glicose, tiamina e asparagina. Foram examinadas 47 amostras de soros, sendo 29 de pacientes com paracoccidioidomicose, seis de pacientes com histoplasmose, seis com aspergilose e seis de doadores sadios. Os componentes do filtrado bruto de *P. brasiliensis* URM 3635 e 5378 foram analisados por SDS-PAGE e após coloração com prata, foram observadas várias bandas, incluindo o componente de 43 KDa. A glicoproteína de 43 KDa é encontrada em *P. brasiliensis*, sendo o mais importante antígeno desse fungo. Soros de 29 (100%) pacientes com PCM não tratados, com Imunoblot (100%) demonstraram anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis*, sete (24,0%) não reagiram com imunodifusão, um (3,5%) não reagiu com contraímuno eletroforese. Imunodifusão e contraímuno eletroforese são técnicas adequadas para o diagnóstico da paracoccidioidomicose, entretanto imunoblot além de ser mais sensível especifica as frações reativas. Soros de doadores sadios e de pacientes com histoplasmose e aspergilose não reagiram nestes ensaios.

Palavras chave: Paracoccidioidomicose, imunoblot, imunodifusão, contraímuno eletroforese.

Introdução

Paracoccidioidomicose (PCM), é uma doença causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina [3]. A doença afeta principalmente os pulmões de onde se dissemina a outros órgãos produzindo injúrias secundárias na mucosa, pele, nódulos linfáticos e glândulas adrenais; fibrose pulmonar pode aparecer como seqüela incapacitante da doença e na ausência de uma terapia efetiva, PCM progride e pode ser fatal [3].

A importância de um diagnóstico preciso e rápido desta micose reside em promover terapia antifúngica, a fim de evitar aumento de dano pulmonar e disseminação do fungo a outros órgãos, e o desenvolvimento de fibrose [20].

Vários métodos têm sido usados no diagnóstico da PCM, os quais podem ser microbiológicos e imunológicos; os primeiros incluem identificação direta de células leveduriformes em amostras clínicas como esputo, espécimens obtidos por biópsias ou escarificação de lesões [20]. Contudo, devido ao tempo e material requerido para realizar essas técnicas, têm sido desenvolvidos os testes sorológicos imunodifusão dupla (ID), contraímuno eletroforese (CIE), imunoblot (IB), ensaio imunoenzimático (ELISA) e outros para detectar anticorpos [16, 24] e antígenos [14, 21]. Entre os antígenos usados nos métodos sorológicos, gp43 é o componente mais estudado de *P. brasiliensis* [6, 8]. Embora os ensaios aplicando gp43 tenham mostrado ser útil para o diagnóstico de paracoccidioidomicose, outros antígenos gp23, gp50, gp70 devem ser considerados [1, 10].

Raramente, com soros de pacientes portadores de PCM são obtidos resultados falso-negativos com ID e CIE; quando posteriormente testados com IB anticorpos anti-gp43 podem ser demonstrados [9], provavelmente devido à sensibilidade relativamente baixa dos testes de precipitação em gel.

Neste trabalho, foi analisada a importância da técnica de imunoblot para diagnóstico da paracoccidioidomicose com antígenos de filtrado de culturas de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme.

Material & Métodos

1 AMOSTRAS DE SOROS

As amostras de soros foram adquiridas do banco de soros do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara e do Centro Especializado em Micologia Médica, UFC, Ceará, obtidas de pacientes com prévio diagnóstico de PCM, histoplasmose e aspergilose, de acordo com método de diagnóstico padronizado de exame direto, cultura e teste sorológico positivo. Esses soros foram primeiramente aliquotados e estocados a -20° C.

Foram examinadas 47 amostras de soros, sendo 29 de pacientes com PCM, seis de pacientes com histoplasmose, seis com aspergilose e seis de doadores sadios.

2 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS

Foram obtidos antígenos de filtrado de culturas de *P. brasiliensis* URM 3635 e 5378 com células leveduriformes cultivadas em meio NGTA (neopeptona 1,6%; glicose 1,0%; tiamina 0,01% e asparagina 0,002%). As culturas foram incubadas durante 15 dias a 37° C sob agitação a 120 rotações por minuto. Após este período, as células foram mortas com timerosal (0,2g/L), filtradas através de papel de filtro (Reagen, RJ, Brazil), e em seguida filtradas em membrana Milipore de 0,22µm; o filtrado foi concentrado 20 vezes e o volume final dializado contra água destilada; a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford [2].

Dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE

Os antígenos foram diluídos em tampão de amostra (0,5 M Tris-HCl, 2% glicerol, 5% Beta-mercaptoetanol, 0,5% de azul de bromofenol, pH 6.8), para obtenção de uma concentração de 20µg/mL de proteínas. As amostras foram separadas por SDS-PAGE-10%, com sistema da BIO-Rad [15]. Foi utilizado um padrão de massa molecular com proteínas de 29- 116 kDa (Sigma-aldrich).

Imunoblot (*Western blot*)

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (0,22µm) (Sigma, St. Louis, MO, USA), por 2h a 150 mA e 1h a 100 mA, usando sistema da BioRad, de acordo com Towbin et al. [26]. As membranas foram bloqueadas por 16h a 4°C em tampão TBS-Tween (0,1%, pH 7.4), contendo caseína 2,5%. Em seguida, as membranas foram incubadas, por 2h a 37°C, com soros diluídos 1:50 em TBS-caseína 1%. A membrana foi lavada 3X vezes em tampão TBS-Tween, 10 min cada. Posteriormente, as membranas foram incubadas, por 1h, com conjugado anti-IgG-HRP humana (Sigma). Foram lavadas 3 vezes e, a reação foi revelada com Tetrametil benzidina (TMB) por 5 min.

3 RESULTADOS & DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com IB foram comparados com alguns anteriormente obtidos com ID e CIE usando os mesmos antígenos e soros.

Os componentes dos antígenos Pb3635 e Pb5378 URM foram demonstrados por SDS-PAGE e, após coloração com prata, foram observadas várias bandas, incluindo o componente de 43 KDa (Figura1).

Soros de 29 pacientes com PCM não tratados foram testados para anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* por ensaio de IB e todos (100%) demonstraram anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis*, sete (24,0%) não reagiram com ID, um (3,5 %) não reagiu com CIE. Soros de doadores sadios e de pacientes com histoplasmose e aspergilose não reagiram nestes ensaios

A glicoproteína de 43 KDa, gp43, é encontrada em *P. brasiliensis*, sendo o mais importante antígeno desse fungo [6, 8]. A mesma é excretada pela célula durante a fase leveduriforme, sendo o principal antígeno para o diagnóstico de PCM. Nossos dados com os antígenos Pb3635 (dados não mostrados) e Pb5378 (Figura 2) também demonstraram a importância de gp43 para o diagnóstico de PCM por IB.

Neste trabalho foi detectado um caso, com resultado falso negativo para ID e CIE, paciente 13, (Figura 2). Do Valle et al. [11] e Vidal et al. [28] constataram que resultados

falso negativos com ID e CIE são normalmente relatados quando pacientes apresentam baixos títulos de anticorpos IgG, contudo IB detecta esses baixos níveis desses anticorpos.

O componente de 43 KDa foi reconhecido por IgG em 16 soros (Fig. 2) e 13 soros (dados não demonstrados), como também foi constatado por [4, 6, 8, 22].

Vários investigadores têm usado a abordagem de imunoblot para estudar a resposta humoral para PCM. Contudo, as preparações antigênicas usadas nestas pesquisas são exoantígenos de filtrados brutos de culturas de diferentes idades [5, 7, 19].

Até agora, a molécula 43 KDa tem sido considerada o principal antígeno para diagnóstico de PCM e induz a uma resposta imune protetora [25, 27]. Entretanto, várias outras glicoproteínas de 22-25 KDa [12], 27 KDa [18], 58 KDa [13], 70 KDa [5] e 87 KDa [14], têm sido amplamente reconhecidas no soro de pacientes com PCM.

Vidal et al. [28] relatam um caso de um paciente com PCM disseminada em cujo soro não foi reconhecida gp43, mas foi revelado anticorpo anti-70KDa; Souza et al. [23] têm sugerido que nem todos epítomos de antígenos expressados por gp43 estão igualmente presentes em todas as amostras de *P. brasiliensis*; Mato-Grosso et al. [17] afirma que gp70 KDa facilita o estabelecimento do fungo e progressão da doença no modelo experimental de infecção primária.

Para estudos sorológicos, sugere-se a cultura 5378URM a qual contém antígeno específico que foi reconhecido por 100% de soros de pacientes com PCM.

Através da IB obtém-se resultados positivos com soros de pacientes com baixos títulos, portanto esta técnica é de fundamental importância no imunodiagnóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com PCM.

Agradecimentos

Os autores agradecem Dra. Maria José Mendes-Giannini pelo fornecimento dos soros.

Referências

1. Bozzi A, Reis BS, Prado FL, Pedrosa EP, Leite MF, Goes AM..Modulation of CD28 and CD86 expression in patients with paracoccidioidomycosis in different periods of treatment. Scand Immunol 2004; 60: 500-505.

2. Bradford A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein by the principle of protein–dye binding. *Ann Biochem* 1976; 72: 248-254.
3. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 89-117.
4. Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 31-38.
5. Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos L.R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J Med Vet Mycol* 1989; 27: 407-412.
6. Camargo ZP, Unterkircher C, Campos SP, Travassos LR. Analysis by Western-blotting of the serological response in paracoccidioidomycosis. *Rev Iber Mycol* 1988; 5 70-77.
7. Casotto M, Paris S, Camargo ZP. Antigens of diagnostic value in three isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1991; 29: 243-253.
8. Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, Silveira JF, Travassos LR.. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem* 1996; 271: 4553-4560.
9. Del Negro GMB, Benard G, Assis CM, Vidal MSM, Garcia NM, Otani C, Shikanai-Yasyda MA, Lacaz CS. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 111–116.
10. Diniz SN, Reis BS, Goes TS, Zouain CS, Leite MF, Goes AM. Protective immunity induced by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 2004, 22: 485-493.
11. Do Valle AC, Costa RL, Fialho-Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancoppe-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2001; 39: 373-377.
12. Figueroa JI, Hamilton A, Allen MH, Hay RJ. Immunohistochemical detection of a novel 22-to 25-Kolodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using species-specific monoclonal antibodies. *J Clin. Microbiol* 1994; 32: 1566-1574.
13. Figueroa JI, Hamilton A, Allen MH, Hay RJ. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 KDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 566-572.

14. Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3278-3283.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227: 680-685.
16. Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 237-342.
17. Mato-Grosso D, Almeida SR, Mariano M, Lopes D. Characterization of gp 70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun* 2003; 71: 6534-6542.
18. McEwen JG, Ortiz BL, García AM, Florez AM, Botero S, Restrepo A. Molecular cloning, nucleotide sequence and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 1996; 20: 125-131.
19. Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM, Masuda A, Amato-Neto V, Ferreira AW. Antibody response to the 43kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 200-206.
20. Restrepo A, Tobo'n AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell G, Bennett SJE, Dollin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Elsevier, Philadelphia, 2005:3062–3068.
21. Silva GF, Barreira MCR. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1992; 35: 381- 390.
22. Silva SH, Grosso DM, Lopes JD, Colombo AL, Blotta MH, Queiroz-Telles F, Camargo ZP. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3675- 3680.
23. Souza MC, Gesztes J, Souza AR, Moraes JZ, Lopes JD, Camargo ZP. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 223-230.
24. Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 554-556.
25. Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which

induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 1998; 66: 786-793.

26. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 4350-4354.

27. Travassos LR, Puccia R, Cissalpino P. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* 1995; 26: 297-304.

28. Vidal MSM, Benard B, Brito T, Dantas KC, Pereira CN, França FAZ, Silva AMG, Martins JEC. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3014-3016.

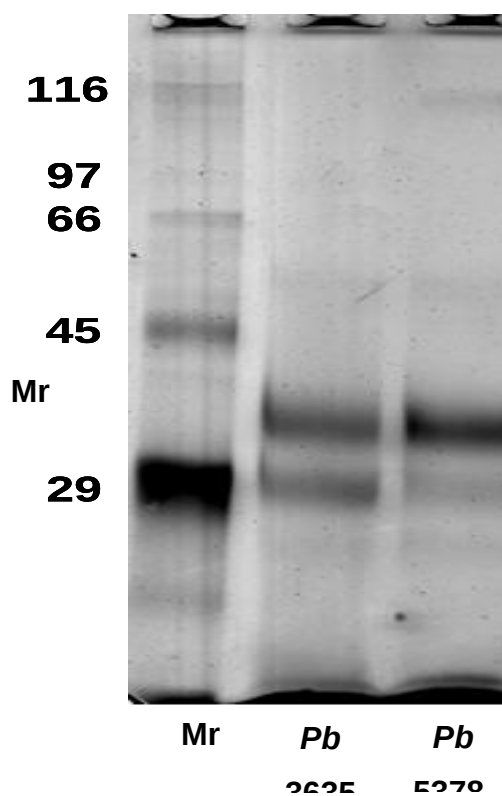


Figura 1. Componentes de exoantígeno bruto de URM *P. brasiliensis* 3635 e 5378 após SDS-PAGE e coloração com prata. Padrão de massa molecular está indicado na esquerda.

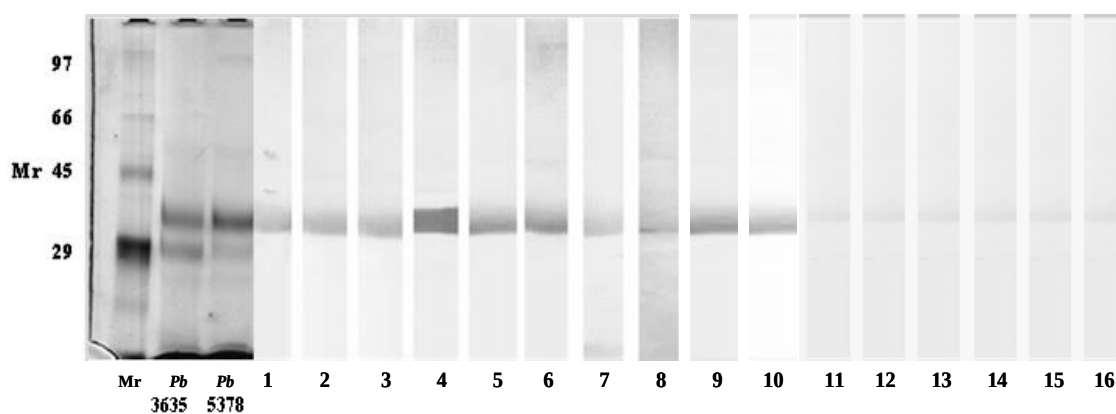


Figura 2. SDS-PAGE de extrato de *P. brasiliensis* 3635 e 5378 e imunoblot de soro de pacientes com paracoccidiodomicose (1-16).