FABÍOLA SILVEIRA GOMES

AVALIAÇÃO DO TESTE DE AGLUTINAÇÃO COM PARTÍCULAS DE LÁTEX SENSIBILIZADAS COM EXOANTÍGENO BRUTO DE *Paracoccidioides brasiliensis* NO SORODIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Helena Marques da Silva

Instituto Evandro Chagas, IEC

Banca Examinadora: Prof. Dr. Antonio Hernández Gutiérrez

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva

Instituto de Ciências da Saúde, UFPA

Prof^a. Dr. Solange do Perpétuo Socorro Evangelista

Costa

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Antônio Carlos do Rosário Vallinoto (suplente)

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 24 de Abril de 2009



DEDICATÓRIA

Dedicado aos meus pais, irmã, amigos e orientadora, causas da minha força de vontade, por terem me incentivado a defender e prosseguir com meus ideais, não me deixando cair diante das dificuldades.

À minha mãe por nunca ter duvidado da minha capacidade, não deixando de acreditar em meus objetivos, sempre acreditando que tinham um fundamento importante para mim. Minha irmã pela admiração, que não é tão justificável, mas que sei que existe.

Aos meus amigos que tenho grande carinho em dizer da felicidade de tê-los, pois sem esse apoio não seria possível seguir em frente com tanta confiança.

Às amigas e colegas de laboratório pelo cotidiano de trabalho e cumplicidade, bem como apoio sempre explícito.

Àqueles que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor pela sabedoria de determinar meu presente com tanta facilidade diante das adversidades da vida, colocando diante de mim pessoas que fizeram tudo se tornar simples.

À minha mãe, irmã e pai pelo amor e admiração dedicados, e pela compreensão de me manter afastada da nossa família por períodos longos.

Aos amigos conquistados desde a infância (Verena) e aos que me adotaram durante a graduação (Elaina, Lílian e Tatiane) os quais sempre incentivaram a fazer o que me realiza.

Às amigas do laboratório (Lívia, Rose, Thifany, Elaine e Dayse), que tanto apoiaram e compartilharam comigo os bons momentos de realizar meu trabalho. Agradeço de coração pelos bons momentos (todos) que passamos, pelas alegrias, lágrimas e confidências divididas.

À Siddharta Gautama pelo incentivo, compreensão e contribuição na conclusão deste trabalho.

Aos amigos que adiquiri na pós-graduação (Roberta, Davi, Rubenilson, Iran e Tiago), que foram muito importantes nos momento críticos desta fase.

À minha orientadora de iniciação científica e amiga Maurimélia Mesquita da Costa pelo carinho e incentivo durante todos esses anos.

À minha orientadora, mãe e amiga Dra. Silvia Helena Marques da Silva pela oportunidade de traçar e moldar ao seu lado minha carreira na micologia, com tamanha confiança e credibilidade. A amizade verdadeira é uma dádiva de poucos e agradeço por encontrar a sua.

Ao programa de pós-graduação em biologia de agentes infecciosos e parasitários em nome de seus coordenadores, CAPES/CNPq e Instituto Evandro Chagas (Seção de Bacteriologia e Micologia) pela oportunidade.

A Universidade Federal do Pará pelos recursos dispostos à qualificação profissional do cidadão e benefício da comunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE	TABELAS	10
LISTA DE	FIGURAS	12
RESUMO		14
ABSTRAC	СТ	15
1	INTRODUÇÃO	16
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1.1	Paracoccidioides brasiliensis e a	19
	PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)	
1.1.2	Diagnóstico da PCM	26
1.1.2.1	Detecção de Anticorpos	29
1.1.2.2	Detecção de Antígenos	34
1.1.2.3	Biologia Molecular e P. brasiliensis	37
1.1.2.4	Diagnóstico Sorológico Utilizando Partículas de Látex	39
1.2	JUSTIFICATIVA	41
1.3	OBJETIVO	42
1.3.1	Objetivo geral	42
1.3.2	Objetivos específicos	42
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	FUNGOS	43
2.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO	43
2.2.1	Amostra de Soro Hiperimune Produzido em Coelho	43
2.2.2	Amostras de Soros de Camundongos	44
	Experimentalmente Infectados	
2.2.3	Amostras de Soros de Pacientes	45
2.3	OBTENÇÃO DE EXOANTÍGENO BRUTO DE <i>P.</i>	45
	brasiliensis	
2.4	CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXOANTÍGENOS	46
	PRODUZIDOS	
2.4.1	Ensaio de Imunodifusão (ID)	46
2.4.2	Dosagem Protéica	47
2.4.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil	47
	Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	

2.4.3.1	Preparo do Gel	47
2.4.3.2	Preparo das Amostras de Exoantígeno Bruto para a	48
	Corrida Eletroforética	
2.4.3.3	Condições de Corrida Eletroforética	48
2.4.3.4	Coloração pela Prata	49
2.5	ACOPLAMENTO DO POOL DE EXOANTÍGENOS ÀS	49
	PARTÍCULAS DE LÁTEX	
2.6	ENSAIO SOROLÓGICO UTILIZANDO PARTÍCULAS DE	52
	LÁTEX SENSIBILIZADAS COM EXOANTÍGENO BRUTO	
	DE P. brasiliensis	
2.7	PRECAUÇÕES DE ORDEM ÉTICA	53
2.8	RECURSOS FINANCEIROS ALOCADOS PARA O	53
	PROJETO	
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3	RESULTADOS	55
3.1	PRODUÇÃO DE EXOANTÍGENOS DE ISOLADOS DE	55
	Paracoccidioides brasiliensis E POOL DE	
	EXOANTÍGENOS	
3.2	CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXOANTÍGENOS E	55
	POOL DE EXOANTÍGENOS	
3.2.1	Ensaio de Imunodifusão (ID)	55
3.2.2	Dosagem Protéica dos Exoantígenos Brutos e Pool de	57
	Exoantígenos	
3.2.3	Perfil Protéico dos Exoantígenos Brutos e Pool de	58
	Exoantígenos por Eletroforese em Gel de	
	Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-	
	PAGE)	
3.3	IMUNODIFUSÃO COM SORO DE CAMUNDONGOS	61
	EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS	
3.4	ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA COM DE	62
	PARTÍCULAS DE LÁTEX SENSIBILIZADAS COM POOL	
	DE EXOANTÍGENOS	
3.4.1	Acoplamento de Proteínas (pool de exoantígenos) em	62

	Partículas de Látex de Poliestireno	
3.4.2	Ensaio de LA Utilizando Tampões PBS e CO ₃ ² -/HCO ₃ -	63
	com Amostras de Soro Não Inativadas de	
	Camundongos Experimentalmente Infectados	
3.4.3	Ensaio de LA com Soro Inativado de Camundongos	64
	Experimentalmente Infectados	
3.4.4	Ensaio de LA Diluídas nas Soluções de Tampões PBS	65
	e CO ₃ ² -/HCO ₃ -	
3.5	ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA COM	67
	PARACOCCILATEX EM AMOSTRAS SORO	
3.5.1	Dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos	67
	pacientes com PCM	
3.5.2	Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com	70
	PCM Utilizando Paracoccilatex	
3.5.3	Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com	75
	Outras Infecções Fúngicas Utilizando Paracoccilatex	
3.5.3.1	Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com	75
	Aspergilose	
3.5.3.2	Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com	76
	Histoplasmose	
3.5.4	Ensaio de LA em Amostras de Soro de Indivíduos com	77
	Outras Infecções Não Fúngicas Utilizando	
	Paracoccilatex	
3.5.5	Ensaio de LA em Amostras de Soro Humano Normal	78
	Utilizando Paracoccilatex	
3.5.6	Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos do	79
	ensaio de LA (Paracoccilatex) e Grau de Concordância	
	entre LA e ID	
4	DISCUSSÃO	80
5	CONCLUSÕES	92
6	PERSPECTIVAS	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	ANEXOS E APENDICES	120

ANEXO I	121
ANEXO II	122
APÊNDICE	123

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1 - Concentração de proteínas por mL de exoantígenos	58
brutos e pool de exoantígenos.	
Tabela 2 - Massas moleculares das proteínas contidas nos	59
exoantígenos e pool de exoantígenos.	
Tabela 3 - Padrões de aglutinação obtidos após testar as partículas	64
de LA nos tampões PBS e ${\rm CO_3}^2$ -/HCO $_3$ utilizando amostras de soro	
de camundongo não inativadas.	
Tabela 4 - Padrões de aglutinação obtidos após testar as partículas	65
de LA nos tampões PBS e ${\rm CO_3}^2$ -/HCO $_3$ - utilizando amostras de soro	
de camundongo inativadas a 56°C.	
Tabela 5 - Padrões de aglutinação obtidos no ensaio de LA diluído	65
em seus respectivos tampões de adsorção (PBS e ${\rm CO_3}^2$ -/HCO $_3$ -),	
utilizando soro de camundongo não inativado e não diluído.	
Tabela 6 - Padrões de aglutinação obtidos no ensaio de LA diluído	66
em seus respectivos tampões de adsorção (PBS e CO ₃ ² -/HCO ₃ -),	
utilizando soro de camundongo inativado e não diluído.	
Tabela 7 - Padrões de aglutinação obtidos com amostra de soro	67
PCM não inativado após teste com Paracoccilatex (LA/ CO ₃ ² -HCO ₃ -).	
Tabela 8 - Padrões de aglutinação obtidos com amostra de soro	67
PCM inativado após teste com Paracoccilatex (LA/ CO ₃ ² -HCO ₃ -).	
Tabela 9 - Principais dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes	68
com PCM.	
Tabela 10 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM	69
gerado pelo teste de ID de acordo com as formas clínicas da doença.	
Tabela 11 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM	70
gerado pelo teste de ID de acordo com o sexo dos pacientes.	
Tabela 12 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM	70
gerado pelo teste de ID de acordo com a ocupação dos pacientes.	
Tabela 13 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM	74
gerado pelo teste de LA (Paracoccilatex) de acordo com as formas	

clínicas da doença.

Tabela 14 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM	74
gerado pelo teste de LA (Paracoccilatex) de acordo com o sexo dos	
pacientes.	
Tabela 15 - Comparação do sorodiagnóstico para PCM gerado pelo	74
teste de LA (Paracoccilatex) de acordo com a ocupação dos	
pacientes.	
Tabela 16 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM	74
gerado pelos ensaios de ID e LA (Paracoccilatex).	
Tabela 17 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM	79
gerado pelos ensaios de LA (Paracoccilatex) em amostras de soro	
de pacientes com PCM e amostras de soro humano normal.	

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Esquema do padrão de orifícios dispostos em lâmina de	46
imunodifusão.	
Figura 2 - Esquema de acoplamento do pool de exoantígenos às	50
partículas de látex.	
Figura 3 - Resultado do ensaio de imunodifusão dos lotes de	56
exoantígenos de <i>P. brasiliensis</i> produzidos.	
Figura 4 - Resultado do ensaio de imunodifusão do pool de	57
exoantígenos de <i>P. brasiliensis</i> produzido.	
Figura 5 - Perfil protéico dos exoantígenos de <i>P. brasiliensis</i> em gel	60
de Gel de poliacrilamida a 10% contendo 5 μg de proteína por	
canaleta. MM , massa molecular (kDa).	
Figura 6 - Perfil protéico do pool de exoantígenos de P. brasiliensis	61
em gel de Gel de poliacrilamida a 10% contendo 5 μg de proteína por	
canaleta. MM , massa molecular (kDa).	
Figura 7 - Imunodifusão positiva de camundongos infectados	62
(Pb113).	
Figura 8 - Distribuição dos pacientes de acordo com o tipo de	68
diagnóstico para PCM. ED, exame Direto; ID, Imunodifusão.	
Figura 9 - Distribuição dos resultados do teste de ID de pacientes	69
com PCM.	
Figura 10 - Distribuição dos pacientes com PCM de acordo com a	70
reatividade no LA (Paracoccilatex).	
Figura 11 - Resultados obtidos com Paracoccilatex em caso positivo	71
(4+) e negativo.	
Figura 12 - Frequência dos padrões de aglutinação observados nas	72
amostras de soro não diluídas reativas no ensaio de LA.	
Figura 13 - Distribuição dos resultados do teste de LA de pacientes	73
com PCM.	
Figura 14 - Reatividade de amostras de soro de pacientes com	76
aspergilose no ensaio de LA com Paracoccilatex.	
Figura 15 - Reatividade de amostras de soro de pacientes com	77

histoplasmose no ensaio de LA com Paracoccilatex.

Figura 16 - Reatividade de amostras de soro de indivíduos sem 78 infecção no ensaio de LA (Paracoccilatex).

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica granulomatosa causada pelo fungo dimórfico Paracoccidioides brasiliensis, é endêmica na América do Sul. Conídios provavelmente agem como propágulos infectantes e são inalados para os pulmões, onde ocorre a transformação à forma leveduriforme patogênica. Duas principais formas clínicas são consideradas: a forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto). O diagnóstico definitivo da PCM inclui a observação direta da levedura multibrotante característica em fluidos biológicos e secções teciduais ou isolamento do fungo de materiais clínicos. Na PCM, testes sorológicos, além de auxílio diagnóstico, têm a função de acompanhamento durante e pós-tratamento. Portanto, a técnica utilizada precisa aliar sensibilidade e especificidade, para que o valor preditivo seja máximo e reprodutível. O propósito deste estudo foi avaliar um teste de aglutinação com látex (LA) para detectar anticorpos anti-P.brasiliensis contra antígeno bruto do fungo. Cingüenta e uma (51) amostras de soro de pacientes com PCM foram testadas. Positividade foi observada em 84,31% (43/51), cujos padrões de aglutinação variaram de 1+ a 4+. Reatividade dessas amostras foi verificada em títulos variando entre 1:2 e 1:64. Reatividade cruzada foi observada com outras doenças fúngicas (aspergilose e histoplasmose), e com doenças não fúngicas. Amostras de soro humano normal não foram reativas. A sensibilidade, especificidade e valores preditivos, positivo e negativo, produzidos pelo teste LA foram 84,31%, 81,05%, 70,49% e 90,59%, respectivamente. Em conclusão, estes resultados mostram que o teste LA é instrumento útil no sorodiagnóstico da PCM, além de vantagens como baixo custo e rápida execução, a despeito de outros testes, tais como ID e Western blotting.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, Sorodiagnóstico, Teste de aglutinação com látex.

ABSTRATC

Paracoccidioidomycosis (PCM), a granulomatous sistemic mycosis caused by dimorphic fungus Paracoccidioides brasiliensis, is endemic in South America. Conidia probably act as the infectious propagules and are inhaled into the lungs where transformation to the pathogenic yeast form occurs. Two main clinical forms are considered: the acute or subacute form (juvenile type) and the chronic form (adult type). A definitive diagnosis of PCM includes direct observation of the characteristic multiple budding yeast in biological fluids and tissue sections or isolation of the fungus from clinical materials. In PCM, serologic tests beside aiding the diagnosis has a monitoring function during and after treatment. Therefore, the technique used needs to ally sensitivity and specificity, in order that the predictive value is maximized and reproducible. The purpose of this study was the evaluation of a latex agglutination (LA) test for detecting anti-P. brasiliensis antibodies by the using of crude antigen from fungus. Fifty-one (51) samples of serum of patients with PCM were tested. Positivity was observed in 84,31% (43/51), whose standards of agglutination varied from 1+ to 4+. Reactivity of these samples was checked in titles varying between 1:2 and 1:64. Crossed reactivity was observed by other fungal diseases (aspergillosis and histoplasmosis), and by diseases not caused by fungi. Samples of human normal serum were not reactive. Use of the LA test permitted the detection of more than 80% of 51 proven PCM cases. The sensitivity, specificity, and positive and negative predictives values were 84,31%, 81,05%, 70,49% and 90,59%, respectively. In conclusion, this results showed that the LA test is a useful tool in serodiagnosis for PCM, beyond of advantages as lower cost and performance when compared to other tests such as ID and Western blotting.

Key words: Paracoccidioidomycosis, Serodiagnosis, Latex agglutination test.

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis (Splendore, 1912) é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), infecção fúngica sistêmica granulomatosa (Lutz, 1908). Este fungo apresenta dimorfismo térmico, pois quando cultivado a 25°C cresce sob a forma filamentosa e, quando infectando o tecido do hospedeiro ou em cultivo a 37°C, apresenta crescimento leveduriforme. Na forma filamentosa, as culturas têm aspecto cotonoso de coloração branca. Microscopicamente, observamse hifas delgadas, septadas e hialinas, nas quais somente são observados clamidosporos como estrutura de reprodução ou disseminação. As colônias na forma leveduriforme têm aspecto cerebriforme de coloração creme. A microscopia revela leveduras multibrotantes de parede celular espessa e birrefringente característica (Brummer, 1993).

A infecção é adquirida pela inalação de propágulos infectantes, provavelmente conídios que ao se instalarem nos pulmões, convertem-se a leveduras multibrotantes, designadas como a forma patogênica (Borges-Walmsley *et al.*, 2002). A paracoccidioidomicose se apresenta sob duas formas principais classificadas como forma aguda ou subaguda - forma juvenil - e crônica unifocal ou multifocal - forma adulta (Montenegro, 1986). O diagnóstico laboratorial da PCM é obtido a partir da visualização de leveduras multibrotantes em espécimes clínicos, seguido da realização de cultura deste material em meios de cultura enriquecidos, tais como BHI (infusão cérebro coração) suplementado com soro fetal bovino e solução de vitaminas. Contudo, testes sorológicos são amplamente utilizados como auxílio no diagnóstico da doença e como instrumento para segmento dos títulos de anticorpos ou antígenos circulantes nos pacientes sob terapia (Brummer *et al.*,1993).

Vários métodos foram descritos, utilizando-se diferentes preparações antigênicas, baseando-se na detecção de anticorpos ou de antígenos, tanto no soro como em outros espécimes clínicos de pacientes (por exemplo, lavado broncoalveolar e líquido cefalorraquidiano) têm variado nos valores de sensibilidade e especificidade obtidos, devido preparação antigênica ou anticorpos utilizados para o ensaio (Mendes-Giannini *et al.*, 1984; McGowan and Buckley, 1985; Cano *et al.*,

1986; Camargo *et al.*, 1988; Camargo *et al.*, 1989; Camargo *et al.*, 1991; Puccia and Travassos, 1991a; Marques-da-Silva *et al.*, 2003). Estas técnicas são praticáveis e restritas apenas aos laboratórios de pesquisa e/ou centros de referência dignóstico, portanto laboratórios com infra-estrutura inferior tais como os laboratórios hospitalares estão excluídos destas vias para diagnóstico.

Uma metodologia sorológica mais simples, a aglutinação com partículas de látex, é amplamente adotada no sorogianóstico para várias etiologias, tanto fúngicas como não fúngicas, nas quais os resultados são efetivos e quando associados com a avaliação clínica pode funcionar como ferramenta no diagnóstico precoce, melhorando o prognóstico do paciente.

Em relação à PCM, a aplicabilidade da técnica de aglutinação foi investigada em um estudo realizadado por Restrepo & Moncada (1978), no qual várias limitações foram observadas, referentes à produção de antígenos e observação de reatividade cruzada, fatores que atualmente podem ser corrigidos pelo emprego de uma preparação antigênica e soluções de trabalho mais adequadas, obetendo-se ao final resultados que permitam a aplicação da metodologia para o sorodignóstico da doença.

O presente trabalho trata da elaboração e avaliação de um teste de aglutinação com partículas de látex, adotando-se o acoplamento de proteínas presentes em pool de exoantígenos brutos derivados da forma leveduriforme de *Paracoccidioides brasiliensis* como preparação antigênica, visando à detecção de anticorpos aglutinantes. Esta preparação antigênica atualmente é adotada no teste de imunodifusão dupla (ID), metodologia indicada ao sorodiagnóstico da PCM.

A avaliação do teste de aglutinação no sorodiagnóstico da PCM se tornou pertinente devido ao anceio de sua utilização como método de diagnóstico precoce da doença, almejando a observação de possíveis vantagens desta técnica em relação ao teste sorológico já padronizado, o teste de ID.

Nesta pesquisa, a possibilidade de utilização da técnica de aglutinação com partículas de látex como sorodignóstico na PCM se baseia no ensaio de soro de

pacientes com PCM confirmada, outras infecções fúngicas e não fúngicas, bem como soro de indivíduos sem infecção (soro humano normal). Os resultados obtidos com soro de pacientes com PCM no teste de aglutinação são comparados aos obtidos com o teste de ID e então se observa a possível relação do potencial diagnóstico do teste desenvolvido.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Paracoccidioides brasiliensis e a Paracoccidioidomicose (PCM)

Como citado anteriormente, *P. brasiliensis* (Splendore, 1912) é um fungo termo-dimórfico, agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), infecção fúngica sistêmica granulomatosa (LUTZ, 1908), cujas principais formas clínicas apresentadas são a aguda (juvenil) e crônica (adulta).

A conversão morfológica da forma filamentosa para levedura depende não somente da variação da temperatura, mas também da composição química específica da parede celular em cada fase morfológica, bem como de alterações no arranjo estrutural dos componentes. Assim, na fase filamentosa ocorrem α -1,3- e β -1,6-glucana e a forma leveduriforme apresenta β -1,3-glucana, ambas contendo quitina na composição da parede celular (BRUMMER *et al.*, 1993).

O habitat deste fungo é desconhecido, contudo existem hipóteses que indicam alguns nichos tais como ambientes e animais aquáticos heterotérmicos como reservatórios naturais e meios de dispersão dos propágulos infecciosos; o solo seria um habitat temporário. *P. brasiliensis* tem sido isolado ocasionalmente de tatus, principalmente *Dasypus novemcinctus*, indicando que este fungo estaria albergado nos órgãos deste animal (NAIFF *et al.*, 1986; BAGAGLI, 1998; CORREDOR *et al.*, 1999; SILVA-VERGARA *et al.*, 2000). Outros animais, habitantes de áreas endêmicas, tais como cães, eqüinos, bovinos, morcegos, gambás e pinguins, também já foram relatados portando *P. brasiliensis*, entretanto em menor grau em comparação os tatus (NEVES *et al.*, 2006).

Terçarioli et al. (2007) observaram que as propriedades envolvidas na composição do solo presente em tocas de tatus de uma área hiper-endêmica em Botucatu (São Paulo) são fatores que contribuem diretamente para a habilidade de crescimento e produção de conídios do fungo, especificamente a umidade e baixos níveis de alumínio do solo mais profundo, o qual não sofre tantas variações de temperatura e umidade quando comparado ao solo superficial. Este seria, pois, o

fator de risco para a infecção de caçadores de tatu e lavradores daquela região. Especula-se a formação de aleuroconídios na fase miceliana do fungo por *stress* nutricional do ambiente no qual o fungo está inserido, agindo como principal estrutura infectante ao homem (RESTREPO, 1985; CONTI DÍAZ, 2007).

A aquisição da infecção é dada pela inalação de propágulos do fungo produzidos durante a forma filamentosa e dispersos no ambiente. Mediante contato com a forma fúngica infectante o indivíduo não necessariamente desenvolverá a doença, isto porque este poderá, partindo da elaboração de uma resposta imunológica adequada, destruir as estruturas fúngicas do foco inicial contidas no granuloma, sendo capaz de conter o foco, regredindo-o, mas mantendo presentes estruturas fúngicas ainda viáveis em um foco latente; ou desenvolverá a doença, apresentando sinais e sintomas (MONTENEGRO & FRANCO, 1994).

Em relação às formas clínicas da doença, a forma aguda ou subaguda é caracterizada pela progressão rápida na qual se observa o envolvimento do sistema reticuloendotelial (baço, fígado, linfonodos, medula óssea), cujos pacientes raramente manifestam lesões cutâneas bem como lesões pulmonares observáveis radiologicamente, sendo atribuídos como anérgicos ou negativos à paracoccidioidomicose. Desenvolve-se em poucas semanas a meses, atingindo de 3 a 5% dos casos, principalmente crianças e jovens de ambos os sexos, sendo a resposta imune celular deprimida, com aumento da resposta específica de anticorpos (BENARD *et al.*, 1996, 1997; FRANCO *et al.*, 1987; MOTA *et al.*, 1985).

A forma crônica acomete mais de 90% dos casos, sendo a maioria homens, resulta de progressão lenta de focos latentes que podem permanecer localizados e em geral, verifica-se o acometimento dos pulmões (unifocal), ou após disseminação linfática ou linfática/hematogênica acometimento de outros órgãos e sistemas (multifocal) tais como pele e mucosas, sistema nervoso central, trato gastrintestinal, tecido ósseo, órgãos genitais e glândulas adrenais (FRANCO *et al.*, 1987). Nos tecidos infectados observa-se a formação de granulomas epitelióides compactos contendo poucos fungos viáveis em seu interior (FRANCO *et al.*, 1987; LONDERO & MELO, 1983).

Em estudo realizado para avaliar a resposta imune humoral dos pacientes com PCM, verificou-se o mesmo padrão de produção de anticorpos IgG para ambas as formas clínicas da doença. Contudo, anticorpos IgM somente foram observados consideravelmente na forma aguda, da mesma maneira que anticorpos IgA se direcionaram à forma crônica (BLOTTA & CAMARGO, 1993).

Juvenali *et al.* (2001), caracterizaram a resposta imune dos pacientes com PCM, e observaram a predominância de altos níveis de anticorpos IgG4 naqueles que apresentavam a forma subaguda da doença e os níveis de IgG2 foram elevados para os pacientes com a forma crônica, os quais mostravam altos níveis de anticorpos IgA, em detrimento do maior grau de acometimento da mucosa. Os anticorpos IgG1 foram elevados em ambas as formas clínicas da doença, contudo nos pacientes com a forma subaguda a resposta foi direcionada às frações antigênicas de baixo peso molecular (inferiores a 43 KDa). Sugeriu-se que na forma subaguda o padrão de resposta imune é tipo Th2 devido à intensa depressão da imunidade celular, sendo que na forma crônica o padrão de resposta imune é do tipo Th1 com intensa produção de interferon-γ (IFN-γ) e mudança de subtipos de anticorpos IgG para IgG2.

O amplo espectro de manifestações clínicas da PCM, como citado anteriormente, observando-se desde infecções assintomáticas à doença disseminada, resulta de fatores relacionados ao hospedeiro, como estado imunológico e, características da cepa infectante, diretamente relacionado à virulência (WANKE & LONDERO, 1994).

Os propágulos de *P. brasiliensis* se aderem ao alvéolo e invadem as células alveolares e a lâmina basal, mediada em parte por uma proteína de 43 kDa do fungo, o antígeno imunodominante e denominado gp43, que propavelmente age como receptor para proteínas da matriz extracelular durante a patogênese (Mendes-Giannini *et al.*, 2000). Contudo, os mecanismos pelos quais a interação ocorre permanecem por elucidar (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; FILLER & SHEPPARD, 2006).

Em modelo experimental de hamster, utilizando injeção intratesticular de leveduras de *P. brasiliensis* adicionadas e não adicionadas de laminina, observou-se maior extensão das lesões, destruição do tecido e formação de granuloma em hamster infectados com leveduras pré-tratadas com laminina e, o intervalo de tempo requerido para estas observações foi menor que naqueles inoculados somente com a levedura. Indicou-se, pois, que esta molécula pode influenciar a patogênese do fungo (VICENTINI *et al.*, 1994).

Caracterizando as proteínas da matriz extracelular envolvidas na interação parasita-hospedeiro em paracoccidioidomicose, MENDES-GIANNINI et al. (2006), observaram que há variação na ligação da proteína de gp43 com laminina, colágeno tipos I e IV dependendo da virulência da cepa infectante, comprovando o envolvimento destas proteínas no desenvolvimento da infecção. Adicionalmente, sugere-se a possibilidade de que pigmentos de melanina ou semelhantes à melanina atuem como fator de virulência, devido à disparidade das quantidades destas moléculas nas formas filamentosa e leveduriforme (GOMÉZ et al., 2001).

Em relação à epidemiologia, os dados obtidos não são precisos devido a PCM não ser uma doença de notificação compulsória. Sendo assim os padrões epidemiológicos são obtidos através de levantamento acerca de indivíduos infectados nas mais variadas regiões, principalmente as conhecidas pela alta endemicidade. Segundo Shikanai-Yasuda *et al.* (2006), em áreas endêmicas a incidência da paracoccidioidomicose varia de 1 a 3 casos por 100 mil habitantes ao ano.

Marques (2003) indica que futuramente com o aperfeiçoamento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) para amostras de solo, poder-se-á inferir sobre o habitat do *P. brasiliensis*. Técnicas como RAPD-PCR (*Ramdomly Amplified Polymorphic DNA*) têm sido aplicadas tanto a amostras ambientais como clínicas de *P. brasiliensis* e indicadas como metodologia útil para estudos epidemiológicos, bem como clínicos (SOARES *et al.*, 1995; HAHN *et al.*, 2003).

Entretanto, atualmente persiste a dificuldade em obter dados epidemiológicos concretos, por fatores tais como a possibilidade do indivíduo ser diagnosticado em

uma região distante daquela onde foi infectado. Sendo assim, Borelli *et al.* (1972), denominaram "reservárea" o local onde o fungo habita de modo sapróbio, ambiente no qual o indivíduo se infecta, diferenciando-o do local de diagnóstico da infecção. Com base nessa denominação 14 reserváreas foram identificadas no Brasil localizadas em florestas tropicais e subtropicais contendo rios, lagos ou córregos e umidade elevada, temperatura variando entre 10 e 28°C e pluviosidade variando de 500 á 2500 mm ao ano, bem como solo caracteristicamente ácido (RESTREPO, 1985; WANKE & LODERO, 1994). Na Colômbia, três reserváreas foram identificadas utilizando como marcadores casos de PCM em crianças. Possuem altitudes entre 1300 e 1700 metros, cuja pluviosidade está entre 2000 e 3000 mm e temperatura de 20°C, aproximadamente, margeada por espécies vegetais de floresta tropical (CADAVID & RESTREPO, 1993). Observa-se que tanto nas reserváreas brasileiras quanto naquelas situadas na Colômbia, as condições climáticas e geográficas são correspondentes (RESTREPO, 1994; WANKE & LODERO, 1994).

Sugerem-se alguns fatores de risco para a aquisição da infecção, tais como idade, sexo, ocupação, etnia, bem como genéticos e hormonais. Homens adultos que têm ocupação referente à agricultura com idade entre 30 e 50 anos são descritos como os indivíduos mais propícios a se infectarem com *P. brasiliensis*, cuja freqüência atinge até 90% dos casos de PCM na forma crônica (RESTREPO *et al.*, 1984; RESTREPO, 1985; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Atribui-se a diferença entre a incidência da PCM, de acordo com o sexo, à maior exposição do homem aos possíveis reservatórios do *P. brasiliensis*, a partir do manejo do solo e atividade agrícola. Tais fatores de risco foram observados e confirmados em lavoura de café no estado de Minas Gerais, onde se isolou o fungo e verificou-se alta positividade quando aplicado teste cutâneo com paracoccidioidina nos moradores do local e trabalhadores desta lavoura (SILVA-VERGARA, 1997).

A proporção de casos de acordo com o sexo varia entre países e mesmo dentro das áreas endêmicas. No Brasil, a proporção é de 10 a 15 homens para uma mulher (BRUMMER *et al.*, 1993). Paniago *et al.* (2003), descreveram a epidemiologia da PCM no Mato Grosso do Sul, no qual entre 1980 e 1999, a proporção foi de 10:1. A desigualdade na proporção não pode ser explicada por

disparidade na exposição desses indivíduos, pois ambos são igualmente expostos, logo uma possível justificativa seria um mecanismo de resistência em mulheres.

Alguns estudos foram conduzidos para verificar a influência hormonal na conversão morfológica do *P. brasiliensis*. Restrepo *et al.* (1984), investigaram a influência da presença de estrogênio na conversão morfológica, utilizando-se de fragmentos de hifas, observando então a inibição da transformação destes em leveduras multibrotantes em maior grau por 17β-estradiol. Sítios de ligação com alta e baixa afinidade para estradiol foram encontrados posteriormente em ambos os estágios morfológicos (STOVER *et al.*, 1986).

Paralelamente à investigação utilizando fragmentos de hifas, conídios foram pesquisados quanto à influência na conversão da forma filamentosa em leveduras multibrotantes *in vitro*, em virtude de conídios serem as prováveis estruturas infectantes ao hospedeiro. Como esperado, sofreram inibição da conversão na presença de 17β-estradiol em concentrações comparáveis àquelas observadas durante o ciclo menstrual (SALAZAR *et al.*, 1988). Com base nestes achados, indica-se a resistência de mulheres na infecção por *P. brasiliensis*, influenciada pelo fator hormonal. Em modelo murino, no qual fêmeas foram analisadas quanto ao desenvolvimento de leveduras multibrotantes após contato com conídios, observouse influência hormonal que o estrogênio exerce na transformação morfológica e assim indicando a resistência ao desenvolvimento da infecção (ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

Referente às etnias, todas são susceptíveis à infecção em função da miscigenação da população de áreas endêmicas, contudo indivíduos não residentes dessas áreas desenvolvem a doença de forma mais severa, em contraste com aqueles indivíduos residentes os quais entram em contato com o fungo e não desenvolvem a doença (WANKE & LONDERO, 1994; CERMEÑO *et al.*, 2004; KALMAR *et al.*, 2004;).

Estudos sobre diferenças imunogenéticas no desenvolvimento da PCM concluíram que o HLA-B40 é o antígeno leucocitário humano mais frequente em pacientes brasileiros e que sua expressão aumenta entre 4,3 e 29,2 vezes o risco de

manifestação da doença. Quando pacientes colombianos foram analisados, os HLA-A9 e HLA-B13 são os mais observados, elevando em torno de 5,5 vezes o risco de desenvolver a doença (WANKE & LONDERO, 1994; BRUMMER *et al.*, 1993). Tais diferenças indicam uma possível influência étnica no desenvolvimento da PCM, contudo mais investigações a respeito dessa possível relação são necessárias.

Fatores de risco externos tais como o tabagismo e alcoolismo foram estudados e demonstraram uma possível influência na manifestação da doença em pacientes que têm o hábito de fumar mais de 20 cigarros de tabaco industrializados por dia, o que elevou em 14 vezes a chance de desenvolvimento, contudo o consumo de álcool seria um co-fator naqueles pacientes que ingerem acima de 50 g/dia (SANTOS *et al.*, 2003).

1.1.2 Diagnóstico da PCM

O diagnóstico definitivo da PCM é gerado pela observação da levedura multibrotante nos mais variados tipos de espéciems clínicos, ou pelo isolamento do fungo em meios de cultura enriquecidos. Testes sorológicos são empregados com sucesso como auxílio no diagnóstico precoce da doença e no segmento sorológico de pacientes depois de adotada a terapia antifúngica (BRUMMER *et al.*,1993). Em alguns casos, o resultado sorológico é a primeira indicação da natureza fúngica da doença, em função do amplo espectro de manifestações clínicas. A importância da utilização de métodos imunológicos no auxílio ao diagnóstico se deve ao fato do menor tempo necessário para o resultado, em detrimento do diagnóstico micológico tradicional, bem como a possibilidade de inferência ao estágio de evolução da doença. Neste ponto, o seguimento sorológico do paciente é realizado com base nos níveis de anticorpos presentes nos fluidos biológicos, tendo em vista que durante a terapia quimioterápica estes tendem a diminuir progressivamente, podendo ser avaliada a resposta do paciente ao tratamento (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1994).

Várias metodologias desenvolvidas com o intuito de obter o diagnóstico por sorologia foram descritas, nas quais os resultados influenciaram na aplicabilidade. Nos centros especializados na América Latina a sensibilidade de testes sorológicos positivos em pacientes com PCM varia de 90 a 95%, embora possa alcançar 100%, dependendo do teste e da forma clínica da doença (MENDES-GIANNINI et al., 1994). A grande maioria desses ensaios foi direcionada à pesquisa de anticorpos no soro de pacientes confirmados e indivíduos residentes de áreas endêmicas e ainda aqueles infectados por outros fungos causadores de micoses sistêmicas ou causados por outros fungos dimórficos, tais como Histoplasma capsulatum (Darling), Blastomyces dermatitidis (GILCHRIST & W. R. STOKES) e Sporothrix schenckii (HECKTOEN & C. F. PERKINS) (NEGRONI et al., 1975; CANO et al., 1986; CAMARGO et al., 1988), Lacazia loboi (PUCCIA & TRAVASSOS, 1991a), bem como micose oportunista por fungos dos gêneros Aspergillus (P.A. Micheli) e Candida, os quais podem gerar reatividade cruzada com soro de pacientes com PCM (WALLENBECK et al., 1984; POLAIN et al., 1985). Infecções bacterianas, tal como a tuberculose, podem ser alvo de resultados falso-positivos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

As preparações antigênicas utilizadas nos ensaios sorológicos empregam antígenos derivados da fase filamentosa ou leveduriforme, consistindo de filtrado de cultura das diferentes morfologias, "cell-free antigen" (CFA), antígeno somático e mistura de antígenos somáticos, citoplasmáticos de leveduras, exoantígeno bruto e antígeno purificado (RESTREPO et al., 1984; MISTRETA et al., 1985, CAMARGO et al., 1989; CAMARGO et al., 1991; TABORDA & CAMARGO, 1994). Contudo, diferentes preparações variam em atividade, reatividade cruzada, qualidade do ensaio no qual serão empregados, e principalmente na reprodutibilidade da metodologia, sendo dependente então da cepa fúngica usada para obtenção do antígeno, morfologia, meio de cultura, tamanho do inoculo e tempo de incubação (CAMARGO et al., 1988). Dados tomados de diferentes estudos indicam que diferentes testes, ou o mesmo teste utilizando diferentes preparações antigênicas, nem sempre fornecem resultados iguais usando o mesmo soro e é aconselhável o uso de dois ou mais testes sorológicos para um diagnóstico definitivo (BRUMMER et al., 1993).

Puccia *et al.* (1986) identificaram o componente antigênico imunodominante específico de *P. brasiliensis*, gp43, constituída de três isoformas com pontos isoelétricos (pl) de 6.7, 6.4 e 6.2. O antígeno foi reconhecido pelo soro de todos os pacientes com PCM diagnosticada, como confirmado posteriormente por Camargo *et al.* (1989) e Blotta & Camargo (1993). Outros componentes antigênicos foram isolados neste trabalho, tais como glicoproteínas de 55 e 72 kDa e um glicoconjugado complexo de alto peso molecular. Porém demonstraram ser alvo para reatividade cruzada, com exceção do segundo.

Observou-se posteriormente que a excreção de gp43 em meios de cultura líquido se processa inicialmente em grandes quantidades durante a fase exponencial de crescimento do fungo, chegando à fase estacionária por volta de 15 dias de incubação (STAMBUK *et al.*, 1988), ocorrendo de maneira estágio-específica na forma leveduriforme (MATTAR-FILHO *et al.*, 1997). O gene que codifica gp43 está presente em várias cópias no gemona e constitui-se de um fragmento de 1329 pares de base formado por dois exons interrompidos por um íntron de 78 pares de base, cuja sequência polipeptídica tem entre 56 e 58% de similaridade com exo-1,3-β-D-

glucanases de Saccharomyces cerevisiae e Candida albicans (Langenbeck), respectivamente (CISALPINO et al., 1996).

Há indícios de que a gp43 seja um importante fator de virulência, cuja interação com as células do hospedeiro seja a base para a patogênese da doença. Isto pois, inicialmente em modelo experimental de hamster, verificou-se a forte e específica adesão desta glicoproteína à laminina, sugerindo função de receptor para esta proteína da matriz extracelular (VICENTINI, *et al.*, 1994). Posteriormente, em ensaio *in vitro* utilizando células Vero, observou-se que *P. brasiliensis* é capaz de aderir e invadi-las através de adesão celular, indicando ainda possibilidade da utilização do parasitismo intracelular como mecanismo de evasão do sistema imune na paracoccidioidomicose (HANNA *et al.*, 2000), apresentando-se ainda como receptor de laminina e fibronectina (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2006). Em relação à indução de resposta imune, a gp43 induz a produção de altos níveis de anticorpos IgG4 em pacientes com a forma juvenil e na forma adulta, níveis elevados de anticorpos IgG2 e IgA (BAIDA *et al.*, 1999).

Além da gp43, uma molécula de 70 kDa (gp70) foi indicada como segunda fração antigênica marcadora do sistema *P. brasiliensis* (PUCCIA *et al.*, 1986), capaz de induzir resposta imune humoral, reconhecido em cerca de 96% de pacientes com PCM não-tratados e cujos níveis de anticorpos detectáveis no soro diminuem mais rapidamente após a terapia antimicótica (CAMARGO *et al.*, 1989). Há produção de anticorpos IgG contra este antígeno em ambas as formas clínicas da doença (45% na forma aguda e 35% na forma crônica), sendo que na forma aguda induz forte resposta imune IgM - 70% - (BLOTTA & CAMARGO, 1993). Mattos-Grosso *et al.* (2003), afirmaram que a gp70 é uma molécula de localização intracelular, contudo expressa na superfície da membrana fúngica, sendo constituída de apenas uma isoforma com pl de 3,4. Descreveram ainda o envolvimento desta molécula como mediadora de um mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, tendo em vista a inibição da atividade de fagócitos via receptores de manose e Fc, diminuindo a liberação de NO e H₂O₂, estando envolvida no estabelecimento e progressão das lesões iniciais.

Demais frações antigênicas, que constituem o complexo antigênico do *P. brasiliensis*, têm sido alvos de diagnóstico micológico e sorológico em laboratórios de pesquisa, contudo a baixa reprodutibilidade bem como o alto custo desses métodos impede a utilização na rotina laboratorial do diagnóstico da PCM. Dentre estes, encontram-se proteínas de baixo peso molecular de 22 e 25 kDa designadas à produção de anticorpos monoclonais a serem utilizados em uma técnica de imunohistoquímica (Figueroa *et al.*, 1994), e proteínas de 27 kDa (MCEWEN *et al.*, 1996; ORTIZ *et al.*, 1996; ORTIZ *et al.*, 1998; CORREA *et al.*, 2006), 28 kDa (REIS *et al.*, 2005), 48 kDa (CASOTTO, 1990; CASOTTO *et al.*, 1991) e 58 kDa (CASOTTO, 1990; FIGUEROA *et al.*, 1995) foram utilizadas no sorodiagnóstico, entretanto fatores como valor preditivo, sensibilidade e especificidade, além da aplicabilidade, foram menores quando comparados aos resultados obtidos utilizando gp43 e gp70.

Um amplo espectro de metodologias foi desenvolvido com o intuito de serem utilizadas no diagnóstico da PCM, utilizando diferentes preparações antigênicas, geralmente contendo grandes concentrações dos dois antígenos imunodominantes, com o objetivo de avaliar sensibilidade e especificidade, tanto na mensuração de anticorpos como antígenos circulantes no soro e outros espécimes clínicos (BLUMER, *et al.*, 1984; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2005, 2006; TABORDA & CAMARGO, 1994).

1.1.2.1 Detecção de Anticorpos

Geralmente a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* é um procedimento muito útil para o diagnóstico, embora em casos de doenças localizadas os títulos permaneçam baixos, enquanto na doença disseminada são altos e caem gradativamente durante a terapia. As variações em relação à sensibilidade e especificidade são devidas aos diferentes tipos de antígenos empregados nos testes.

O teste de fixação de complemento, primeiramente descrito por Moses (1916), usava extrato de *P. brasiliensis* em solução salina, fornecendo sensibilidade

de 80%. A sensibilidade foi aumentada para 90% quando se utilizou antígeno polissacarídico no teste para monitorar a resposta ao tratamento (FAVA NETO, 1961; NEGRONI et al., 1975). Comparação entre testes utilizando antígeno derivado de filtrado de cultura da forma leveduriforme mostrou que os testes de imunodifusão quantitativo e imunofluorescência indireta tiveram maior sensibilidade em relação ao teste de imunodifusão qualitativo e fixação de complemento. Neste trabalho a sensibilidade do teste de imunodifusão quantitativo foi de 95% e sugeriu-se que títulos a partir de 1:32 geram diagnóstico específico e seria seguro para utilização no seguimento sorológico de pacientes em tratamento, sendo mais vantajoso que o teste de fixação de complemento devido à melhor aplicabilidade na rotina laboratorial (Restrepo & Moncada, 1972). Posteriormente, confirmou-se a especificidade deste teste com base na caracterização das linhas de precipitação geradas por soros de pacientes com a doença ativa e aqueles sob quimioterapia, cujo aparecimento de uma linha de precipitação próxima do orifício contendo o antígeno denominada banda 1 foi dita específica, seguindo-se da presença de outras duas bandas designadas bandas 2 e 3 de localização intermediária e próxima ao orifício contendo soro positivo, respectivamente. O número de bandas observadas está relacionado à severidade da doença (SIQUEIRA, 1982; MENDES-GIANNINI et al., 1994). No que se refere ao seguimento sorológico a última linha de precipitação a desaparecer foi a banda 1, no qual apenas 27,7% dos pacientes analisados após um período de 2-3 anos de terapia não eram respondedores a esta banda 1 (Restrepo & Moncada, 1974).

Em ensaio utilizando imunoeletroforese, Yarzábal (1971) identificou 25 arcos e indicou que um deles, com migração catódica, denominado arco E, identificado e caracterizado posteriormente como antígeno E2 (YARZÁBAL *et al.*, 1977), seria específico para pacientes com PCM devido ausência de reatividade cruzada com soro de pacientes com outras micoses. Verificou-se que a banda 1 e o antígeno E2 correspondem à gp43 (PUCCIA *et al.*, 1986), antígeno imunodominante no sistema *P. brasiliensis*, presente em 95 a 98% dos pacientes com a doença ativa. Vários tipos de preparações antigênicas foram empregados no teste de imunodifusão, tais como filtrado de cultura da fase filamentosa (BLUMER *et al.*, 1984), extrato citoplasmático de leveduras (McGOWAN *et al.*, 1985), cell-free antigen {CFA} (CAMARGO *et al.*, 1991), entretanto o exoantígeno bruto derivado da forma

leveduriforme foi instituído como preparação antigênica mais indicada para o sorodiagnóstico pela imunodifusão devido à simplicidade na produção e maior estabilidade quando comparado aos demais, além do importante fato de produzir sensibilidade em torno de 94% e especificidade de 100% sendo o valor preditivo de 100% (CANO & RESTREPO, 1987; CAMARGO *et al.*, 1988).

Técnicas imunoenzimáticas foram empregadas para fins tanto diagnóstico como de seguimento terapêutico, aplicando diversas preparações antigênicas obtendo-se, pois, diferenças na sensibilidade e especificidade. O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) foi testado no sorodiagnóstico para PCM primeiramente partindo de antígeno metabólico derivado de leveduras, no qual 95% dos soros de pacientes com a doença foram detectados com densidade óptica superior a 0,150 a uma diluição de 1/400. Contudo, soros de pacientes com histoplasmose e candidíase foram detectados acima do valor limite de positividade indicado para PCM (Camargo *et al.*, 1984a). Melhores resultados foram obtidos com um *magnetic-ELISA* (*Magnetic-Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), utilizando antígeno somático, verificou-se somente 14,2% de reatividade cruzada com soro de pacientes com histoplasmose, no qual a taxa de densidade óptica dos soros positivos para PCM esteve entre 0,8 e 2,6 (CAMARGO *et al.*, 1984b), indicando também melhores resultados no seguimento sorológico dos pacientes quando comparado a outros testes, como fixação de complemento (CAMARGO *et al.*, 1986).

Mendes-Giannini *et al.* (1984), avaliaram um ELISA de absorção (ABS-ELISA), cujo antígeno derivou de filtrado de cultura leveduriforme do *P. brasiliensis*, observando alta sensibilidade (100%), no entanto, a especificidade do ensaio foi diminuída pela reatividade cruzada com soro de pacientes com outras doenças micóticas, tais como histoplasmose, doença de Jorge Lobo, criptococose e candidíase. Mesmo com a utilização de proteína purificada (gp43), purificada e tratada com metaperiodato (agente antioxidante) e, adsorvida com células de *C. albicans*, a especificidade do ELISA não excedeu 84%, provavelmente devido à maior exposição de epítopos de carboidrato constituintes da gp43 após o acoplamento em placas de poliestireno, sugere-se que uma possível melhora nos resultados pode estar no emprego de gp43 purificada deglicosilada ou no emprego de mais de um componente antigênico (PUCCIA & TRAVASSOS, 1991a,b;

ALBUQUERQUE *et al.*, 2005; DÍEZ *et al.*, 2003). Apesar da reatividade cruzada, o ELISA tem demonstrado bons resultados também na diferenciação dos níveis de anticorpos produzidos nas diferentes formas clínicas e no seguimento sorológico de pacientes com PCM durante o tratamento (DEL NEGRO *et al.*, 2000; MAMONI *et al.*, 2001).

Capture Enzyme Immunoassay (c-EIA), utilizando anticorpos monoclonais anti-gp43 para detecção de imunoglobulina G anti-gp43, demonstrou maior sensibilidade e especificidade que os outros ensaios enzimáticos - 100% e 96,7%, respectivamente (CAMARGO et al., 1994). Contudo, o emprego desta metodologia na rotina laboratorial implica a obrigatoriedade de equipamento e profissionais especificamente qualificados no preparo dos constituintes do método, como antígeno purificado e anticorpo monoclonal, apesar de pouco tempo requerido para o resultado.

Os títulos de anticorpos analisados por um *erythro-immunoassay* (EIA) comparou os resultados obtidos com duas preparações antigênicas distintas (peptídeo-polissacarídico e filtrado de cultura liofilizado), obtendo sensibilidade de 100% com a utilização de antígeno derivado de filtrado de cultura da fase leveduriforme do fungo, após o processo de adsorção deste com células de *C. albicans* mortas. Observou-se melhor especificidade a partir de uma diluição do soro de 1:3200. Contudo reatividade cruzada foi gerada com soro de pacientes com histoplasmose e candidíase (CAMARGO *et al.*, 1984c).

Taborda & Camargo (1993), obtiveram ótimos resultados em um ensaio de hemaglutinação passiva usando exoantígeno bruto de leveduras de *P. brasiliensis* e gp43 purificada, no qual considerando o cut off de 1/200, a sensibilidade e especificidade foram de 100%, indicando ainda que esta diluição elimina a reatividade cruzada com soro de pacientes com outras micoses.

Após a identificação dos principais componentes antigênicos do sistema *P. brasiliensis* (PUCCIA *et al.*, 1986), o ensaio de dot blot foi avaliado como sorodiagnóstico da PCM, baseado na utilização de exoantígeno de leveduras, gerando sensibilidade de 100% para gp43 e 96% para gp70. A reatividade cruzada

com soro de pacientes com histoplasmose foi minimizada pela diluição do soro a 10⁻³ (CAMARGO *et al.*, 1989). O immunoblotting tem sido utilizado no auxílio diagnóstico e seguimento dos pacientes sob quimioterapia, revelando tanto sensibilidade como especificidade de 100%, necessitando da utilização de preparações antigênicas, tais como exoantígeno bruto, que contenham grande concentração de gp43 e gp70, ou antígeno purificado. Em termos de reatividade cruzada e resultados falso-positivos, a reação de soros de pacientes com outras micoses ou mesmo saudáveis foi observada em torno de 4,3% (BLOTTA & CAMARGO, 1993; TABORDA & CAMARGO, 1994).

Atualmente a técnica mais empregada no diagnóstico da PCM é a imunodifusão (ID), devido à facilidade na execução, baixo custo, além da sensibilidade desta técnica, que fica em torno de 96 a 100%, como citado anteriormente. Porém, infelizmente, são poucos os laboratórios da América Latina que praticam este método, provavelmente devido à falta de pessoal capacitado e treinado, ou ainda instalações laboratoriais insuficientes (CAMARGO *et al.*, 2003).

As glicoproteínas vêm sendo amplamente utilizadas como substrato em testes detecção anticorpos diagnósticos para de durante а PCM, glicoesfingolipideos com resíduos de galactofuranase terminais também podem ser empregados (BERTINI et al., 2007). A produção e utilização de proteínas recombinantes em vetores como Escherichia coli (DINIZ et al., 2002) e Pichia pastoris (CARVALHO et al., 2008) tem possibilitado a obtenção de quantidades expressivas de proteína com alto potencial de detecção de anticorpos específicos em testes sorológicos, tais como Imunodifusão e Western blotting. Não somente a gp43 tem sido alvo de recombinação, mas também outras proteínas, como por exemplo, a HSP60 de P. brasiliensis, que após a purificação se obtem uma proteína de 62 kDa capaz de ser reconhecida por 97,3% dos soros de pacientes com PCM em um ensaio de Western blotting (CUNHA et al., 2002).

1.1.2.2 Detecção de Antígenos

A partir do sucesso obtido com metodologias direcionadas à detecção de antígenos circulantes em outras doenças fúngicas, tais como candidíase (MATTHEWS & BURNIE, 1988), criptococose (SNOW & DISMUKES, 1975), aspergilose (Weiner & Coats-Stephens, 1979) e histoplasmose (WHEAT, et al., 1986), investigações foram conduzidas com o intuito de detectar antígenos circulantes de *P. brasiliensis* nos fluidos biológicos de pacientes com a doença. Inicialmente, ensaios de imunoprecipitação foram capazes de detectar antígenos circulantes no soro de pacientes, estabelecendo uma correlação entre a presença de antígenos e a doença ativa e, provando ser um instrumento promissor para o diagnóstico da PCM. Contudo, não houve caracterização das frações antigênicas às quais os pacientes desenvolveram a resposta imunológica humoral (RODRIGUES, et al., 1984; GARCIA et al., 1987).

A gp43 foi detectada no soro de pacientes com a forma aguda e crônica da doença utilizando anti-soro monoespecífico de coelho, imunizado com gp43 derivada de filtrado de cultura parcialmente purificado (MENDES-GIANNINI, et al., 1989). Neste ensaio, um pool de soros de pacientes com diagnóstico de PCM e antes de iniciado o tratamento, bem como pool de soro de pacientes com dois anos de seguimento terapêutico, foram caracterizados imunologicamente por imunoblotting. O pool de soro foi injetado em uma coluna de afinidade acoplada com imunoglobulinas G de anti-soro de coelho, seguida de eluição da coluna e análise do eluato em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Observou-se que antes de iniciada a terapia quimioterápica, o soro apresentava considerável quantidade de gp43 circulante e após dez meses de tratamento esses níveis diminuem, sendo que em dois anos de tratamento esta não é detectável, correlacionando-se a detecção deste antígeno com a melhora clínica do paciente ou cura clínica. Devido à similaridade antigênica, soros de pacientes com histoplasmose apresentaram a banda de 43 kDa, indicando a natureza da reatividade cruzada vista nos ensaios para detecção de anticorpos(MENDES-GIANNINI, et al., 1989).

Em estudo direcionado à padronização de um método alternativo para inferir a atividade da PCM em pacientes com ambas as formas clínicas da doença, IRMA (*Immunoradiometric assay*) foi desenvolvido, utilizando-se imunoglobulina G policional de coelho imunizado com antígeno citoplasmático, observado como melhor preparação antigênica neste ensaio. O método foi sensível para detectar concentrações de antígenos circulantes a partir de 0,12 μg/mL (3,6 ng), no qual a reatividade cruzada foi visível somente em soros não diluídos de pacientes com histoplasmose (FERREIRA-DA-CRUZ *et al.*, 1991).

Métodos imunoenzimáticos foram empregados para avaliar a antigenemia de pacientes com Paracoccidioidomicose. Freitas-da-Silva & Roque-Barreira (1992), a partir de ELISA-c (*Competitive enzyme-linked immunosorbent assay*), demonstraram maior sensibilidade para detecção de antígenos de *P. brasiliensis* em pacientes com a forma aguda grave (48,4%), cuja faixa de detecção variou entre 0,03 e 3,4 μg/mL, indicando a viabilidade deste para o seguimento sorológico, bem como assegurando a correlação entre baixos níveis de antígenos circulantes com melhora clínica do paciente, neste caso observado após nove meses de terapia. Após a introdução de anticorpos monoclonais em ensaios imunoenzimáticos para detecção de antígenos, tanto sensibilidade como especificidade, foram melhoradas.

O primeiro trabalho descrevendo a utilização de anticorpos monoclonais no estudo da PCM, foi desenvolvido com inh-ELISA (*inhibition ELISA*) utilizando anticorpos monoclonais IgG de camundongos BALB/c direcionados a uma proteína de 87 kDa, derivada de filtrado de cultura de leveduras de *P. brasiliensis*, que revelou sensibilidade de 100% de detecção de antígenos em pacientes com a forma aguda e, 83,3 % e 60% respectivamente para as formas crônica unifocal e multifocal, detectando concentração média de antígenos de 15 μg/mL de soro. Entretanto, a reatividade cruzada foi alta com soros de pacientes acometidos por outras micoses tais como aspergilose e histoplasmose. Neste teste, avaliou-se também a presença deste antígeno na urina daqueles pacientes com a doença ativa, encontrando-se uma concentração média de 8,37 μg/mL. Contudo, reação cruzada com amostras de pacientes com histoplasmose foi frequente (GÓMEZ *et al.*, 1997).

Dados derivados de EIA-c (*Competition enzyme assay*) e imunoblotting avaliando antigenúria indicam este espécime clínico como um bom instrumento para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes sob terapia (SALINA *et al.*, 1998).

O inh-ELISA também gerou resultados satisfatórios em relação ao seguimento sorológico dos pacientes, no qual se obteve correlação significativa (p < 0.001) entre o declínio da concentração de antígeno circulante nos fluidos biológicos dos pacientes com PCM, de ambas as formas clínicas, e a melhora ou mesmo cura clínica (GÓMEZ *et al.*, 1998).

Recentemente, Marques-da-Silva et al., (2003; 2005; 2006), empregaram o inh-ELISA para avaliar a antigenemia de pacientes com Paracoccidioidomicose, utilizando anticorpos monoclonais direcionados às proteínas marcadoras do sistema P. brasiliensis, gp43 e gp70, em espécimes clínicos tais como soro, lavado broncoalveolar e líquido cefalorraquidiano. A gp43 esteve presente em 100% dos soros de pacientes com a forma aguda e crônica unifocal da doença em concentrações médias de 18,23 µg/mL e 7,64 µg/mL, respectivamente. Na forma crônica multifocal 95,31% dos pacientes analisados demonstraram concentração média de gp43 circulante de 8,64 μg/mL. Amostras de líguido cefalorraquidiano e lavado broncoalveolar também foram 100% reativas neste ensaio, com concentrações médias de 19,26 µg/mL e 16,06 µg/mL, respectivamente, provando serem espécimes viáveis para o diagnóstico da PCM. Em relação à antigenemia de gp70 avaliada por esta metodologia, níveis mais altos foram observados no soro (11,86 μg/mL), seguido de lavado broncoalveolar (7,5 μg/mL) e líquido cefalorraquidiano (6,78 µg/mL), onde esteve presente em 100% das amostras testadas, com exceção de soros de pacientes com a forma crônica multifocal (98,43%).

A sensibilidade destes ensaios variou de acordo com o espécime clínico ficando em torno de 90 a 100%. Contudo, a especificidade foi de 100%. O sucesso deste método foi também obtido no seguimento de pacientes em tratamento com itraconazol, nos quais os níveis de antígenos circulantes declinam de forma correlacionada com a diminuição dos níveis de anticorpos, sendo que após 12

meses de tratamento os níveis de gp43 foram menores que 5 μ g/mL e os de gp70 indetectáveis (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2004a; 2004b). Apesar do sucesso da metodologia tanto no diagnóstico como no seguimento de pacientes após a instituição do tratamento, a viabilidade de uso na rotina clínica é desconhecida (WHEAT, 2006).

A despeito de métodos sorológicos, uma proteína de choque térmico (hsp) de 87 kDa foi purificada e utilizada para produção de anticorpos monoclonais a serem empregados em imunohistoquímica de biópsia de pacientes com diagnóstico comprovado de PCM. Os resultados obtidos indicaram que a metodologia, baseada na ligação de anticorpos monoclonais (Mabs) P1B à hsp 87 kDa de *P. brasiliensis*, pode ser utilizada com sucesso na observação das células do fungo (DÍEZ *et al.*, 2002).

1.1.2.3 Biologia Molecular e *P. brasiliensis*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo direcionada à detecção de DNA de *P. brasiliensis* em espécimes clínicos de pacientes com PCM, tais como escarro e líquido cefalorraquidiano, utilizando primers de oligonucleotídeos e degenerado, obtendo alta sensibilidade e especificidade, no qual sequências de 0,6 kb e 0,72 kb foram específicas em resultados para escarro e líquido cefalorraquidiano, respectivamente (GOMES *et al.*, 2000; CAVALCANTI *et al.*, 2003; SAN-BLAS *et al.*, 2005).

Após o sequenciamento do gene codificante da gp43 (CISALPINO et al., 1996), o desenho de primers específicos para esta seqüência alvo têm sido um dos principais esforços para garantir a alta especificidade de metodologias diagnósticas baseadas na PCR. Além deste alvo, sequências de subunidades de rDNA (28S, 18S e 5.8S) provaram ser um bom meio de investigação epidemiológica e etiológica, pela obtenção de sondas DNA-específicas de *P. brasiliensis*, em análise de amostras de solo e órgãos de tatus, as quais foram úteis para evidenciar a presença do fungo nesses materiais, bem como em comparação a outros agentes etiológicos de micoses sistêmicas, tal como *Blastomyces dermatitidis* (SANDHU et al., 1997;

BIALEK *et al.*, 2000b; HEBELER-BARBOSA *et al.*, 2003; TERÇAROLI *et al.*, 2007). Particularmente, a utilização de sondas, tem possibilitado o conhecimento de proteínas possivelmente relacionadas à patogenicidade do fungo, como por exemplo, a observação de diferenças na expressão do gene de *hsp70* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* (PETROFEZA DA SILVA *et al.*, 1999).

Ensaios de *Nested* PCR foram conduzidos em modelo experimental, na detecção de DNA fúngico em amostras de tecido pulmonar de camundongos infectados e, em amostras de soro de pacientes com as diferentes formas clínicas de PCM, também baseados em primers para detecção de sequência de gp43, sendo que os resultados obtidos demonstraram a detecção de um fragmento de 196 pb em amostras de tecido e, baixos níveis de DNA detectáveis no soro (BIALEK *et al.*, 2000a; CHARBEL *et al.*, 2006).

Análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido adotada para inferir similaridade genética entre diferentes isolados de *P. brasiliensis*, na tentativa de associar os padrões de amplificação com o perfil de virulência do fungo. O objetivo central destes trabalhos é conhecer futuramente variações específicas que confiram aos diferentes isolados graus de virulência (SOARES *et al.*, 1995; CALCAGNO *et al.*, 1998; HAHN *et al.*, 2003; HEBELER-BARBOSA *et al.*, 2003). Diferenças filogenéticas já foram detectadas em *P. brasiliensis*, sugerindo que existam três espécies do fungo (S1, PS2 e PS3), cujas diferenças foram observadas por análise de sequências de microsatélites (MATUTE *et al.*, 2006).

Transcriptomas de *P. brasiliensis* estão sendo amplamente gerados, partindose de ensaios de microarranjo de cDNA (DNA complementar) baseados em análise de EST (*Expressed Sequence Tag*), nos quais diversas proteínas vêm sendo caracterizadas quanto ao nível de expressão durante as alterações morfológicas e fisiológicas sofridas pelo patógeno durante a infecção, permitindo a sugestão de possíveis papeis dessas proteínas na patogenia da doença (GOLDMAN *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2005; FELIPE *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2005; PARENTE *et al.*, 2005; TAVARES *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007).

1.1.2.4 Diagnóstico sorológico utilizando partículas de Látex

Ensaios de aglutinação com partículas de látex têm sido desenvolvidos para o diagnóstico das mais variadas etiologias de doenças infecciosas, tais como vírus (DEWAR et al., 2005), bactérias (HULL-JACKSON et al., 2006), protozoários (ÖNCEL et al., 2005; DOOR et al., 2005; SUNDAR et al., 2005) e algumas micoses, como esporotricose (BLUMER et al., 1973), criptococose (TANAKA et al., 1994), aspergilose (DUPONT et al., 1990), candidíase (STICKLE et al., 1972), histoplasmose (HILL et al., 1962; GERBERT et al., 1972) e coccidioidomicose (HUPPERT et al., 1968), variando quanto à sensibilização das partículas, com a utilização de antígenos brutos ou purificados a anticorpos monoclonais, interferindo então na sensibilidade e especificidade dos resultados obtidos.

Para a maioria dessas infecções o teste de aglutinação com partículas de látex está padronizado a nível comercial. Observa-se a comercialização do teste para infecções virais, no qual em estudo comparativo para o diagnóstico de rotavírus, baseado na utilização de partículas sensibilizadas com anticorpos monoclonais, produziu-se sensibilidade e especificidade de 57% e 93%, respectivamente (DEWAR et al., 2005). Sensibilidade e especificidade mais elevadas foram observadas (87% e 99%, respectivamente) com a utilização de anticorpos policionais anti-*Leishmania* no kit comercial KAtex para o diagnóstico da leishmaniose visceral (Sundar et al., 2005). Em infecções bacterianas, por exemplo, antígenos foram utilizados em um teste comercial visando a pesquisa de anticorpos IgM durante o curso da leptospirose obtendo boa sensibilidade e especificidade - 88% e 98%, respectivamente - (HULL-JACKSON et al., 2006).

Referente ao teste de aglutinação no diagnóstico de micoses, geralmente no diagnóstico da criptococose e aspergilose, os kits comerciais utilizam anticorpos monoclonais ou policionais para sensibilizar as partículas nos quais são obtidos bons resultados com alta sensibilidade e especificidade, variando entre 93-97% e 100%, respectivamente (KISKA *et al.*, 1994; TANNER *et al.*, 1994; VERWEIJ *et al.*, 1995). Com a utilização de antígenos na sensibilização, o teste gerou sensibilidade mais elevada que testes já padronizados, como a imunodifusão, chegando a 95% no

diagnóstico da candidíase sistêmica, enquanto que a especificidade variou de 89% a 100% (STICKLE *et* al., 1972).

Estudo conduzido por Restrepo & Moncada (1978) utilizando partículas de látex sensibilizadas com antígenos derivados de filtrado de cultura das fases filamentosa e leveduriforme, tratados e não tratados com etanol, foi avaliado com o objetivo de diagnosticar a PCM em grupo de pacientes. Os resultados obtidos revelaram melhor aplicabilidade da metodologia quando empregado antígeno derivado da fase leveduriforme sem tratamento, cuja sensibilidade foi de 69,5% para pacientes com a doença ativa e 63% para aqueles em tratamento. Em termos de reatividade cruzada, 46,8% dos soros de pacientes com histoplasmose reagiram com partículas de látex-paracoccidioidina, sendo que resultados específicos foram observados a uma diluição do soro de 1:32. Reações falso-positivas foram pouco observadas, da mesma maneira que a reatividade de soro de pacientes com tuberculose, bem como doadores de sangue, chegando a 18,5% da população estudada. Observou-se neste trabalho que pelo menos 70% de casos de PCM podem ser diagnosticados precocemente pela metodologia, e ainda houve concordância de 90,4% com resultados de outros testes sorológicos, tais como imunodifusão fixação е de complemento.

1.2 JUSTIFICATIVA

Devido o teste de aglutinação com partículas de látex ser uma técnica simples, de fácil e rápida execução e que não necessita de pessoal especializado ou de equipamentos automatizados para leitura e obtenção dos resultados, optou-se pela sua avaliação como metodologia ao sorodiagnóstico da PCM. Desta maneira, com a obtenção dos resultados, sua aplicabilidade tornar-se-ia possível em regiões cujos laboratórios de análises clínicas possuam menos infraestrutura que aqueles que praticam testes mais elaborados. Com isto o disgnóstico dos pacientes residentes nestas regiões efetuar-se-ia precocemente, melhorando seu prognóstico.

Recentemente, Camargo *et al.* (2003), produziram e padronizaram exoantígeno bruto obtido da forma leveduriforme do *P. brasiliensis* em meio de cultura líquido, cuja composição sabidamente estimula a excreção de grandes quantidades do principal antígeno responsável pelo desenvolvimento da resposta imune humoral dos pacientes com PCM, promovendo elevadas sensibilidade e especificidade ao teste de imunodifusão dupla. Tendo em vista os resultados e a elevada reprodutibilidade do emprego desta preparação antigênica no teste de imunodifusão, tornou-se apropriado sua utilização neste trabalho. Em relação às soluções nas quais ocorre o acoplamento do antígeno em partículas de látex de poliestireno, sabe-se que deve ocorrer em faixas de pH próximas ao pl da proteína de trabalho. Com a adequação das condições de reação, referente tanto à produção de preparação antigênica que produza o mínimo possível de reações cruzadas ou falso-positivas, como das condições do meio em que a reação se processa, pode-se desenvolver um teste com qualidade e que possibilite obter resultados fidedignos, visando obter sensibilidade e especificidade elevadas.

A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir sobre sua aplicabilidade como teste diagnóstico precoce e, principalmente como uma metodologia de triagem de pacientes em laboratórios menos especializados, tais como os de rotina laboratorial nos hospitais de áreas endêmicas. Desta maneira, a confirmação da etiologia poderia ser baseada em testes sorológicos padronizados utilizados em laboratórios de referência, tais como imunodifusão dupla e *Western blot*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar um teste de aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com exoantígenos bruto do fungo termo-dimórfico *P. brasiliensis* para ser utilizado como auxílio no diagnóstico da paracoccidioidomicose.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Preparar exoantígenos de diferentes isolados de *P. brasiliensis* e analisar o seu perfil protéico em gel de SDS-PAGE;
- Avaliar se os exoantígenos obtidos respondem no ensaio de imunodifusão com soro controle:
- Sensibilizar partículas de látex com pool de exoantígenos brutos de *P. brasiliensis;* e realizar teste piloto utilizando soro de animais experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*;
- Avaliar o ensaio com partículas de látex sensibilizadas com pool de exoantígenos bruto de *P. brasiliensis*, em amostras de soro de pacientes com diagnóstico confirmado de paracoccidioidomicose;
- Avaliar o ensaio com partículas de látex sensibilizadas com pool de exoantígenos bruto de *P. brasiliensis*, em amostras de soros de pacientes com outras infecções fúngicas e não fúngicas;
- Avaliar o ensaio com partículas de látex sensibilizadas com pool de exoantígenos bruto de *P. brasiliensis*, em amostras de soros de indivíduos saudáveis (Soro Humano Normal);

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 FUNGOS

Foram utilizados no estudo os isolados fúngicos Pb113, Pb34 e PbIOC de *P. brasiliensis*. Estes são mantidos na micoteca da Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI) no laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas. Os isolados Pb113 e Pb34 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo da Escola Paulista de Medicina.

O isolado Pb113 foi obtido da micoteca da FMUSP, cedida pelo Prof. Lacaz, em 1980; Pb34 foi isolado de fezes de pingüim da Antártida no Uruguai; Pb IOC foi gentilmente cedido pelo Instituto Oswaldo Cruz

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO

2.2.1 Amostra de Soro Hiperimune Produzido em Coelho

Foram produzidos soros hiperimunes anti-*P. brasiliensis* em coelhos machos adultos para a realização do ensaio de imunodifusão. Este soro hiperimune serviu como controle positivo.

Para a produção de soro hiperimune, exoantígenos brutos produzidos a partir dos isolados fúngicos, foram inoculados no dorso de coelhos cedidos pelo Biotério do Instituto Evandro Chagas. O dorso dos animais foi depilado anteriormente e, 400 µg de exoantígeno produzido foi emulsificado (mesmo volume de exoantígeno utilizado) em adjuvante de Freund completo e 30 µL aproximadamente desta mistura, foi aplicado (intradérmico) por ponto no dorso do animal. O protocolo de inoculação e o intervalo entre uma e outra imunização utilizado são descritos a seguir:

Quadro 1: F	Esquema de	e imunização	para obten	cão de soro l	hiperimune em	coelhos
Quadro 1. L	-oquenna at	, iiiiaiiizayao	para obteri	çuo uc solo i		CCCIIICS

Dose/Dia	Inoculo	Via
1°	Adjuvante completo de Freund +	Subcutânea
	Ag 400 μg	
10°	Adjuvante Incompleto de Freund +	Intramuscular
	Ag 400 μg	
20°	Adjuvante Incompleto de Freund +	Intramuscular
	Ag 400 μg	
30°	Adjuvante Incompleto de Freund +	Intramuscular
	Ag 400 μg	
35°	Sangrar* – Titular o soro pela ID	Endovenosa – Veia
		marginal-Orelha
40°	Adjuvante Incompleto de Freund +	Endovenosa – Veia
	Ag 400 μg	marginal-Orelha
50°	Sangrar – Titular o soro pela ID	Punção cardíaca

Após se conseguir uma resposta adequada em ensaio de imunodifusão (ID) com os animais imunizados com os exoantígenos (títulos podendo variar de 1:8 a 1:32), o sangue do animal foi coletado por punção cardíaca. Os soros foram separados e aliquotados em eppendorf e armazenados a -20°C.

2.2.2 Amostras de Soros de Camundongos Experimentalmente Infectados

Camundongos *Swiss* machos, pesando cerca de 30 g e com idade entre dois e três meses foram experimentalmente infectados (infecção intraperitoneal) com leveduras de *P. brasiliensis*. Cada grupo de dez animais foi inoculado com uma suspensão de leveduras de *P. brasiliensis* para cada isolado fúngico utilizado no trabalho (Pb113, Pb34 e PbIOC). Sendo assim, cerca de 30 animais receberam cada um o equivalente a 5X10⁵ células de leveduras, inoculadas assepticamente no peritônio. Os animais receberam anestésico inalatório antes de ser inoculada a suspensão de leveduras e uma amostra de sangue foi coletada para servir como controle (sem infecção). Após inoculação os animais foram acompanhados diariamente e sangrados após um, dois e três meses de infecção. Cada amostra de sangue coletada foi analisada em ensaio de imunodifusão e em seguida no ensaio com as partículas de látex sensibilizadas. Após três meses de acompanhamento os animais que resistiram à infecção foram sacrificados.

2.2.3 Amostras de Soros de Pacientes

Foram utilizadas 51 amostras de soro de pacientes com diagnóstico clínico, micológico e/ou sorológico de paracoccidioidomicose (PCM). Todas as amostras de soro dos pacientes foram testadas previamente pelo ensaio de imunodifusão.

Foram utilizadas 26 amostras de soro de pacientes com outras doenças fúngicas (11 de pacientes com histoplasmose e 15 aspergilose), 49 com outras infecções e 20 amostras de soro humano normal (controle negativo), todas negativas no ensaio de imunodifusão dupla com antígeno de *P. brasiliensis*.

NOTA: Todas as amostras de soro de pacientes que foram utilizadas neste projeto estavam armazenadas em freezer -20°C e fazem parte da soroteca do Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas e/ ou Laboratório de Sorologia das Micoses da Escola Paulista de Medicina. Essas amostras de soro foram encaminhadas ao laboratório das referidas instituições para esclarecimento diagnóstico.

2.3 OBTENÇÃO DE EXOANTÍGENO BRUTO DE P. brasiliensis

Os isolados foram repicados em meio de YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) e mantidos a 35°C, com vários repiques sucessivos até a sua completa reversão para a fase leveduriforme. Após a reversão completa dos isolados, a produção de exoantígeno bruto foi realizada segundo a técnica padronizada por CAMARGO et al., (1988).

As culturas de *P. brasiliensis*, fase leveduriforme foram repicadas para vários tubos contendo meio ágar YPD e cultivadas a 35°C, por três dias. O crescimento fúngico total de pelo menos dez tubos foi transferido com auxílio de alça de platina para frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de caldo meio YPD, constituindo assim o pré-inóculo e cultivado durante três dias, sob agitação constante, a 50rpm, a 35°C. A seguir, o pré-inóculo foi transferido para frascos do tipo Fernbach com capacidade para 2800 mL, contendo 450 mL de meio e cultivado

por sete dias, sob as mesmas condições descritas para o pré-inóculo. Após o crescimento foram feitos esfregaços, corados pelo método de GRAM e observados ao microscópio óptico para verificar se havia contaminação bacteriana. Quando constatada a não contaminação, as culturas foram mortas pela adição de mertiolato de sódio (0,2 g/L) por 24 a 48 horas a 4°C.

O filtrado foi concentrado vinte vezes, por evaporação a vácuo, a 40°C e dialisado contra água destilada, a 4°C, com várias trocas por 48 horas. A seguir o dialisado foi filtrado e a preparação final constitui o antígeno bruto.

2.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXOANTÍGENOS PRODUZIDOS

2.4.1 Ensaio de Imunodifusão (ID)

Todos os exoantígenos produzidos foram testados em ensaio de imunodifusão (ID) para verificar se os mesmos produziam linha de precipitação quando em contato com soro hiperimune anti-*P. brasiliensis*.

Foi seguida basicamente a técnica de Ouchterlony (1949), com modificações. O suporte foi agarose a 1% em salina tamponada com fosfatos 0,1 M (*Phosphate Buffer Solucion* - PBS). Lâminas de vidro (25x75 mm) foram recobertas com 3 mL de agarose fundida. O gel de agarose foi então perfurado com um molde perfurador de gel cujo esquema é um orifício central e seis ao redor deste, todos medindo 3 mm de diâmetro e distanciados 6 mm. Cada orifício tem capacidade para 10 μ L. No orifício central foi colocado 10 μ L do exoantígeno a ser testado e nos demais 10 μ L do soro controle hiperimune (Figura 1).

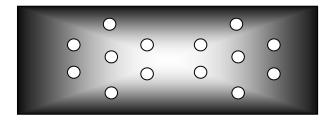


Figura 1 – Esquema do padrão de orifícios dispostos em lâmina de imunodifusão.

As lâminas foram incubadas por 24 horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida. A seguir, lavadas por uma hora em citrato de sódio a 5%, seguidas de três a cinco lavagens em solução salina 0,85%, por uma hora cada, sendo que na última lavagem permanecerão por 24 horas. As lâminas, então foram envoltas em papel de filtro umedecido com água destilada e levadas a 37°C por 24 horas para secagem.

As lâminas foram coradas com "Coomassie Brilhant Blue" a 0,15%, em solução de etanol, água destilada e ácido acético (4:4:1), durante 10 minutos e descoradas pelo mesmo diluente.

2.4.2 **Dosagem Protéica**

A concentração protéica dos exoantígenos foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão Soro Albumina Bovina (BSA) e monitoradas em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

2.4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O perfil protéico dos exoantígenos produzidos foi analisado em gel de SDS-PAGE para verificar qual a melhor preparação antigênica que deveria ser utilizada para sensibilizar as partículas de látex.

2.4.3.1 Preparo do Gel

O gel para eletroforese vertical foi preparado segundo Laemmli (1970), em uma cuba de eletroforese vertical para mini gel, constando de um gel de separação linear a 10% de acrilamida e um gel de empilhamento a 3% de acrilamida, polimerizando entre duas placas de vidro separadas por espaçadores com 0,75 mm

de espessura. Um pente com dez canaletas foi utilizado para a aplicação das amostras.

Os géis foram preparados a partir de soluções dos reagentes nas seguintes proporções:

Quadro 2: Proporção de reagentes para eletroforese em gel com SDS-PAGE.

Solução estoque	Gel de	Gel de
	separação (10%)	empilhamento (3%)
Acrilamida-bisacrilamida (30%:0,8%)	5 mL	0,65 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,2%	3,75 mL	
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,2%		1,25 mL
Água bidestilada	6.25 mL	3,05 mL
Persulfato de amônio a 10%	50 μL	25 μL
TEMED	10 μL	5 μL

2.4.3.2 Preparo das Amostras de Exoantígeno Bruto para a Corrida Eletroforética

Volumes contendo 2 µg de amostras foram diluídas individualmente em tampão de amostra (Tris-HCl 0,068 M, pH 6,8; 2,3% de SDS; 10% de glicerol; 0,1% de azul de bromofenol), adicionados de 2-mercaptoetanol a 5% como agente redutor, no momento do uso. As amostras foram aquecidas a 100°C por três minutos e aplicadas nas canaletas do gel.

2.4.3.3 Condições de Corrida Eletroforética

A corrida eletroforética foi feita a 25 mA até que o corante azul de bromofenol chegue ao final do gel. O tampão de corrida utilizado foi o Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; 0,1% de SDS e pH final 8,3.

2.4.3.4 Coloração pela Prata

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com água bidestilada e corado pela prata, obedecendo às seguintes etapas:

Quadro 3: Protocolo de coloração pela prata.

Número	Solução	Tempo (minutos)
1	Metanol 50% + ácido acético 12% +	15
	formaldeído 0,01%	
2	Água bidestilada	05
3	Etanol 50%	10
4	Etanol 50%	10
5	Etanol 50%	10
6	Água bidestilada	05
7	Tiossulfato de sódio 0,2 g/L	10
8	Água bidestilada	05
9	Nitrato de Prata 2 g/L + 700 μL de formaldeído a 37%	10
10	Água bidestilada	05
11	Solução reveladora (Carbonato de sódio 60	Até revelar as
	g/L+ Tiossulfato de sódio 4 mg/L + 500 μL de formaldeído a 37%)	bandas
12	Água bidestilada	05
13	Metanol 50% + ácido acético 12%	05
14	Metanol 50%	02
15	Água bidestilada	05

Todos os reagentes foram dissolvidos em água bidestilada e cada etapa foi realizada sob agitação leve. Os géis foram secos entre membranas de celofane e devidamente documentados.

2.5 ACOPLAMENTO DO POOL DE EXOANTÍGENOS ÀS PARTÍCULAS DE LÁTEX

Uma vez produzidos os exoantígenos e realizado o controle de qualidade, estes foram misturados (pool de exoantígenos) e acoplados as partículas de látex.

A figura 2 ilustra esquematicamente o ensaio de acoplamento.

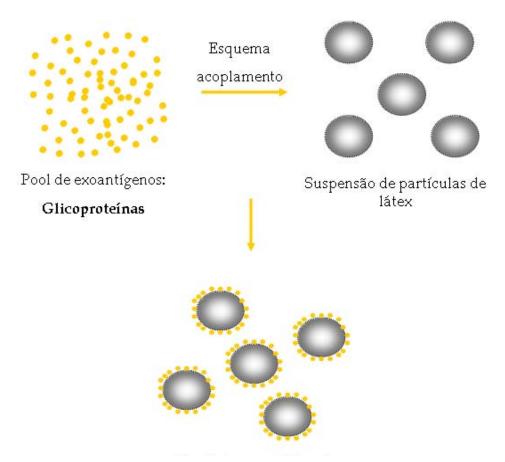


Figura 2 – Esquema de acoplamento do pool de exoantígenos às partículas de látex.

Uma alíquota de 100 μ L de suspensão de partículas de látex de poliestireno com 0,8 μ m de diâmetro (Invitrogen) foi diluída em 900 μ L de tampão de adsorção (tampão de baixa resistência iônica, com pH igual ou próximo ao pl da proteína), obtendo-se por fim uma solução a 1% (10 mg/mL) com volume total de 1 mL foi produzida.

A suspensão diluída foi lavada e centrifugada duas vezes no tampão de adsorção. Em seguida, a suspensão de partículas de látex foi adicionada ao pool de exoantígeno (400 μg) e agitado delicadamente de uma a duas horas a temperatura ambiente. A mistura foi incubada *overnight* a 4°C em agitador orbital, o que caracteriza a reação como adsorção passiva. Após a incubação, esta mistura foi centrifugada, para remover o sobrenadante (que foi guardado para posterior

determinação da quantidade de proteínas do exoantígeno que não acoplaram ao látex). O precipitado foi ressuspenso em tampão de bloqueio (tampão de adsorção com 0,01 - 0,1% BSA) e mantido sob agitação leve por uma a duas horas. Após centrifugação, a solução foi suspensa em tampão de adsorção e então armazenada a 4°C.

O quadro 4 descreve o protocolo de acoplamento do pool de exoantígenos as partículas de látex.

Quadro 4: Acoplamento do pool de exoantígenos as partículas de látex.

Quadro 4. Acopiamento do poor de exoantigenos as particulas de latex.						
Número	Realizar	Tempo				
1	Solubilizar 100 μL de suspensão de partículas de					
	látex em 900 μL de tampão de adsorção					
2	Centrifugar a 13 000 rpm	10 min				
3	Desprezar o sobrenadante					
4	Ressuspender em 1000 μL de tampão de					
	adsorção					
5	Centrifugar a 13 000 rpm	10 min				
6	Desprezar o sobrenadante					
7	Adicionar a preparação antigênica e completar o					
	volume para 1000 μL com tampão de adsorção					
8	Manter sob leve agitação	Overnight				
9	Centrifugar a 13 000 rpm	10 min				
10	Retirar o sobrenadante					
11	Suspender em 1000 μL de tampão de bloqueio					
12	Manter sob leve agitação	1-2 h				
13	Centrifugar a 13 000 rpm	10 min				
14	Retirar o sobrenadante					
15	Suspender em 1000 μL de tampão de adsorção					

^{*} Tampões de adsorção testados : PBS ou CO₃²-/HCO₃-

Os tampões de adsorção testados para o ensaio de acoplamento foram PBS pH 7.4 e Carbonato-Bicarbonato (CO₃²-/HCO₃-) pH 9.2, escolhidos mediante faixa de pH adequado ao do material antigênico utilizado. Os quadros 5 e 6 ilustram o protocolo de preparação dos tampões PBS e Carbonato-Bicarbonato, respectivamente.

Quadro 5: Preparo do tampão de adsorção PBS pH 7.4.

Reagentes	Quantidade
Fosfato de potássio dibásico	1,82 g
Fosfato de sódio monobásico	0,22 g
Cloreto de sódio	8,76 g
Água deionizada qsp	1000 mL

Quadro 6: Preparo do tampão de adsorção Carbonato-Bicarbonato pH 9.2.

Reagentes	Quantidade	
Solução 0,1M de carbonato o	4 mL	
Carbonato de sódio anidro Água deionizada	10,6g 1000 mL	
Solução 0,1M de bicarbonato	46 mL	
Bicarbonato de sódio 8,4g Água deionizada 1000 mL		
Água deionizada qsp	200 mL	

2.6 ENSAIO SOROLÓGICO UTILIZANDO PARTÍCULAS DE LÁTEX SENSIBILIZADAS COM EXOANTÍGENO BRUTO DE *P. brasiliensis*

Vinte e cinco microlitros (25 μL) de soro e 25 μL da suspensão de látex sensibilizadas foram depositados na superfície de uma lâmina de vidro escuro (adequado para visualização da aglutinação) misturados delicadamente por pelo menos cinco minutos e a leitura foi feita visualmente. Vê-se, pois, que a aglutinação é passiva. Isto porque o teste sorológico ocorre pelo contato e leve agitação da amostra de soro com a solução de partículas de látex sensibilizadas. A figura 3 esquematiza a aglutinação de partículas de látex sensibilizadas testadas com uma amostra reativa.

No presente trabalho o ensaio foi realizado com amostras de soro provenientes dos animais infectados experimentalmente e com amostras de soro de pacientes com diagnóstico de paracoccidioidomicose, cujas amostras de soro encontravam-se armazenadas em freezer a -20°C.

2.7 PRECAUÇÕES DE ORDEM ÉTICA

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos e animais do Instituto Evandro Chagas, sendo aprovado sob o Nº 0011/2007 (Apêndice I).

2.8 RECURSOS FINANCEIROS ALOCADOS PARA O PROJETO

Os recursos financeiros adquiridos para o desenvolvimento do projeto foram adquiridos junto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sendo aprovado no Edital MCT/CNPq 15/2007-Universal, sob processo Nº 471106/2007-0 (Apêndice II).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007), empregando os testes estatísticos qui-quadrado (χ^2) e teste G para relações contidas em tabelas 2x2.

A determinação dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo foram calculados de acordo com as relações ilustradas a seguir:

Sensibilidade:

Especificidade:

Valor preditivo positivo:

Valor preditivo negativo:

ONDE:

VP: verdadeiros positivos

VN: verdadeiros negativos

FN: falso negativos

FP: falso positivos

O grau de concordância entre os testes ID e LA foi estabelecido a partir da relação a seguir (Martins *et al.*, 1995):

$$\frac{(A+D)}{(A+B+C+D)}$$
 x 100

ONDE:

A: é uma amostra com resultado positivo em ambos os ensaios, LA e ID;

B: é uma amostra com resultado positivo no LA, mas negativo no ID;

C: é uma amostra com resultado negativo no LA, mas positivo no ID;

D: é uma amostra com resultado negativo em ambos os ensaios, LA e ID;

O desenho experimental do estudo está ilustrado no Apêndice III.

3 **RESULTADOS**

3.1 PRODUÇÃO DE EXOANTÍGENOS DE ISOLADOS DE *Paracoccidioides* brasiliensis E POOL DE EXOANTÍGENOS

Foram obtidos seis lotes de exoantígenos brutos, sendo dois lotes de exoantígenos brutos do isolado Pb34, três lotes do isolado Pb113 e um lote do isolado PbIOC. A partir desta obtenção, o pool de exoantígenos foi produzido pela mistura de alíquotas equivalentes de cada exoantígeno bruto.

A preparação antigênica foi submetida ao ensaio de imunodifusão para verificar a reatividade do soro controle positivo frente às proteínas imunogênicas presentes neste extrato.

3.2 CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXOANTÍGENOS E POOL DE EXOANTÍGENOS

3.2.1 Ensaio de Imunodifusão (ID)

Baseado na técnica de imunodifusão descrita por Ouchterlony (1949), com modificações. Todos os exoantígenos produzidos foram positivos neste ensaio, sendo observada a formação de linhas de precipitação entre os exoantígenos e o soro controle.

A Figura 3 ilustra os resultados obtidos no ensaio de imunodifusão para cada um dos lotes de exoantígenos, nos quais se observou que todos foram reativos no controle de qualidade (teste de ID com soro hiperimune). O primeiro lote derivado do isolado Pb 34 (A) revelou forte reação com a formação de uma linha de precipitação, enquanto que o segundo lote revelou a formação de duas linhas de precipitação (B). O primeiro lote derivado do isolado Pb113 (C) mostrou uma fraca reação com a formação de apenas uma linha de precipitação entre exoantígeno e soro controle.

Os demais lotes provenientes deste isolado (D e E), produziram reações mais fortes com duas linhas de precipitação entre exoantígeno e soro controle. O único lote de exoantígeno derivado do isolado PbIOC (F), apresentou quatro linhas de precipitação.

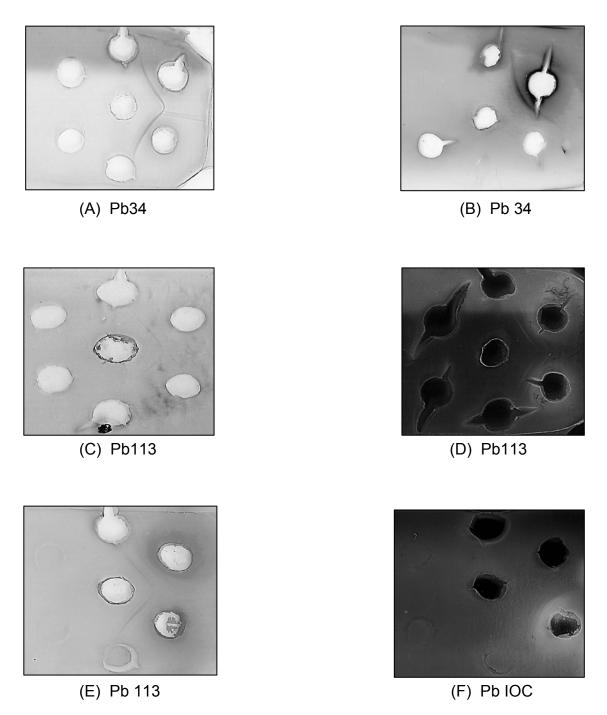


Figura 3 - Resultado do ensaio de imunodifusão dos lotes de exoantígenos de *P. brasiliensis* produzidos.

A partir da observação da positividade dos lotes de exoantígenos brutos com soro controle positivo (soro hiperimune produzido em coelhos) no ensaio de ID, o pool de exoantígenos também foi analisado no ensaio de ID. Sendo assim, quando submetido ao ensaio de ID revelou positividade até a diluição de 1:32 do soro controle positivo, no qual puderam ser visualizadas duas linhas de precipitação entre pool de exoantígeno e soro controle (Figura 4). Desta forma a preparação antigênica estava apta ao uso no ensaio de acoplamento com partículas de látex.

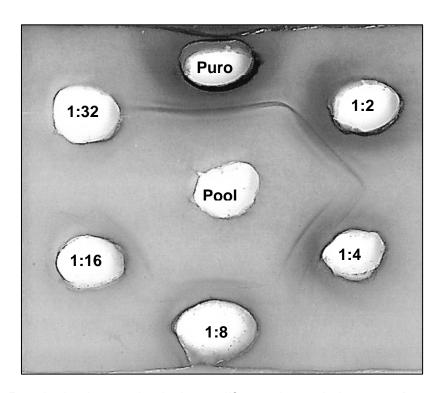


Figura 4 - Resultado do ensaio de imunodifusão do pool de exoantígenos de *P. brasiliensis* produzido.

3.2.2 Dosagem Protéica dos Exoantígenos Brutos e Pool de Exoantígenos

A partir do emprego do método de Bradford (1976), utilizando Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão, pôde-se quantificar a concentração de proteínas por mililitro (mL) de exoantígeno bruto de cada isolado, bem como do pool desses exoantígenos. A tabela 1 mostra a quantificação de proteínas verificadas nos exoantígenos brutos produzidos e pool de exoantígenos.

Tabela 1 - Concentração de proteínas por mL de exoantígenos brutos e pool de exoantígenos.

Isolado	Lote	Concentração protéica (µg/mL)
Pb34	1°	1500
Pb34	2°	1000
Pb113	1°	940
Pb113	2°	760
Pb113	3°	1520
PbIOC	1°	1310
Pool		1570

3.2.3 Perfil Protéico dos Exoantígenos Brutos e Pool de Exoantígenos por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Foram dispostas quantidades referentes a 5 μg de proteína por canaleta do gel de poliacrilamida (10%) para cada exoantígeno. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado empregando o protocolo de coloração pela prata, descrito anteriormente.

A tabela 2 ilustra o conteúdo de proteínas presentes em cada exoantígeno bruto, assim como no pool de exoantígenos.

Tabela 2 - Massas moleculares das proteínas contidas nos exoantígenos e pool de exoantígenos.

Exoantí	geno	Massas moleculares (kDa)								
Isolado fúngico	Lote	120	70	65	50	47	43	35	30	≤ 20
Pb34	1º		Х		Х		Х		Х	Х
Pb34	2°		Χ				Χ			Χ
Pb113	1°		Χ							Χ
Pb113	2°	Χ	Χ						Χ	Χ
Pb113	3°		Χ						Χ	Χ
PbIOC	1°	X								
Pool		Х	Х	Х	Χ	Χ	Χ	Х		Х

Os exoantígenos brutos de *P. brasiliensis* obtidos apresentaram um perfil protéico bem diversificado de proteínas, com massas moleculares inferiores a 20 kDa, atingindo até 120 kDa.

A principal proteína imunodominante e considerada marcadora do sistema paracoccidioidomicose, a proteína de 43 kDa (gp43), esteve presente em quantidades expressivas, seguida da proteína de 70 kDa (gp70) em quase todos os lotes obtidos.

A Figura 5 ilustra o perfil protéico dos exoantígenos em gel de poliacrilamida após a corrida eletroforética e coloração pela prata.

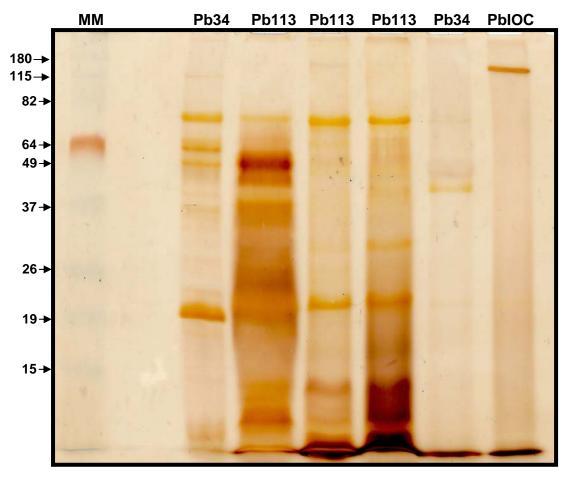


Figura 5 - Perfil protéico dos exoantígenos de *P. brasiliensis* em gel de Gel de poliacrilamida a 10% contendo 5 μg de proteína por canaleta. **MM**, massa molecular (kDa).

O pool de exoantígenos apresentou perfil diversificado de proteínas, no qual puderam ser visualizadas expressivas quantidades da proteína de 70 kDa (gp 70), 65 kDa, 50 kDa, 43 kDa (gp 43) e de proteínas com massas moleculares inferiores a 20 kDa. A figura 6 ilustra o perfil protéico do pool de exoantígeno.

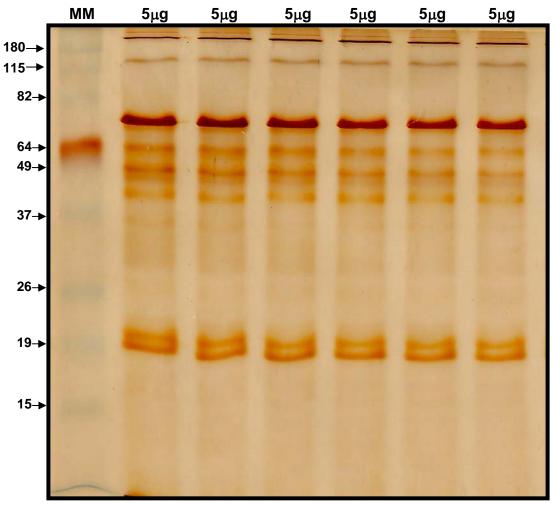


Figura 6 - Perfil protéico do pool de exoantígenos de *P. brasiliensis* em gel de Gel de poliacrilamida a 10% contendo 5 μ g de proteína por canaleta. **MM**, massa molecular (kDa).

3.3 IMUNODIFUSÃO COM SORO DE CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Após a inoculação das leveduras de *P. brasiliensis* e seguimento dos animais por cerca de três meses, foi observado que somente o grupo de camundongos infectados com o isolado Pb113, produziu resposta positiva com a formação de uma linha de precipitação observada no ensaio de imunodifusão. Sendo esta resposta positiva verificada somente após o segundo mês de infecção.

A figura 7 ilustra a positividade destes camundongos no ensaio de imunodifusão.

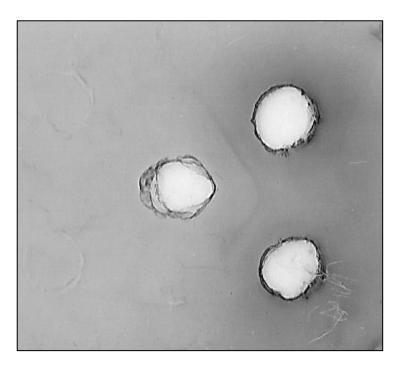


Figura 7 - Imunodifusão positiva de camundongos infectados (Pb113).

3.4 ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA COM DE PARTÍCULAS DE LÁTEX SENSIBILIZADAS COM POOL DE EXOANTÍGENOS

3.4.1 Acoplamento de Proteínas (pool de exoantígenos) em Partículas de Látex de Poliestireno

Foram testados dois tampões de adsorção para o ensaio de acoplamento das proteínas do pool de exoantígenos as partículas de látex. Os tampões foram escolhidos com base na faixa de pH, sendo este adequado e/ou equivalente ao valor do ponto isoelétrico (pl) das proteínas constituintes do pool de exoantígenos, dessa maneira gerando o mínimo de interferências no micro ambiente da reação passiva de acoplamento.

Os tampões utilizados foram o *Phosphate Buffer Solution* (PBS) pH 7.4 e Carbonato-Bicarbonato (CO₃²⁻/HCO₃⁻) pH 9.2.

Seguindo o protocolo de acoplamento anteriormente descrito (item 2.5), foram utilizados 400 μ g (255 μ L) de pool de exoantígenos para sensibilizar a solução de partículas de látex. Desta maneira, após a obtenção da solução final, procedeu-se o controle de qualidade da mesma, testando-a com o soro de camundongos infectados experimentalmente. A figura 7 ilustra o acoplamento do pool de exoantígenos brutos de *P. brasiliensis* às partículas de látex.

A dosagem protéica do sobrenadante recuperado após o acoplamento passivo do pool de exoantígenos, revelou que são necessários cerca 200 μg de proteínas para saturar a superfície das partículas de látex contidas em um mililitro (1 mL) de suspensão a 1% nas condições de acoplamento adotadas neste trabalho, bem como as características referentes ao perfil protéico do pool utilizado.

3.4.2 Ensaio de LA Utilizando Tampões PBS e CO₃²/HCO₃- com Amostras de Soro Não Inativadas de Camundongos Experimentalmente Infectados

Foram dispostos em lâminas de vidro escuro (que permitem a leitura visual da aglutinação) 25 μL de amostra de soro de camundongos infectados experimentalmente, utilizando-se amostras de soro não inativadas, não diluídas e previamente diluídas em salina 0,85% (1:2 até 1:8) e, acrescido 25 μL da solução de LA não diluída, testando-se separadamente as soluções derivadas do acoplamento com os tampões de adsorção PBS pH 7.4 e CO₃²/HCO₃ pH 9.2.

NOTA: Amostras de soro não inativadas são aquelas testadas diretamente após o descongelamento da amostra, sem qualquer medida prévia para proceder ao teste.

Após 5 minutos da homogeneização e agitação manual da lâmina de vidro, pôde-se observar o resultado.

A reação demonstrou aglutinação caracterizada como 1+ (uma cruz) na amostra de soro não diluída, devido à formação de grumos grosseiros depositados na parte inferior do material, imersos em solução turva, tanto na solução de PBS como naquela de CO₃²-/HCO₃- (Quadro 9).

As diluições do soro foram testadas e o padrão de aglutinação 1+ foi observado até a diluição de 1:4, também nas duas soluções (tabela 3). O controle negativo utilizado em todos os testes foi uma alíquota de 15 μ L de solução de trabalho (com PBS ou com CO_3^2 -/HCO $_3$ -, separadamente) e 15 μ L de solução salina 0,85%.

Tabela 3 - Padrões de aglutinação obtidos após testar as partículas de LA nos tampões PBS e CO₃²⁻/HCO₃- utilizando amostras de soro de camundongo não inativadas.

Amostra de soro	Padrão de aglutinação Solução de LA		
_	PBS	CO ₃ ² /HCO ₃	
Não diluída	1+	1+	
1:2	1+	1+	
1:4	1+	1+	
1:8	-	-	

3.4.3 Ensaio de LA com Soro Inativado de Camundongos Experimentalmente Infectados

O ensaio com LA foi utilizado em amostra de soro inativado de camundongos infectados experimentalmente. A inativação das amostras de soro ocorreu pelo aquecimento da amostra á 56°C em banho-maria. Este procedimento tem por finalidade desprender possíveis complexos imunes na amostra, facilitando assim a ligação de anticorpos presentes na amostra às partículas de látex sensibilizadas. Empregaram-se as mesmas condições descritas anteriormente. Na solução preparada com PBS, obteve-se padrão de aglutinação 1+ na amostra não diluída. Contudo, as diluições se apresentaram negativas. Na solução preparada com CO₃²⁻/HCO₃-, a aglutinação (1+) foi verificada na amostra não diluída e na diluição de 1:2 (tabela 4).

Tabela 4 - Padrões de aglutinação obtidos após testar as partículas de LA nos tampões PBS e CO₃²-/HCO₃- utilizando amostras de soro de camundongo inativadas a 56°C.

Amostra de soro		e aglutinação ção de LA
	PBS	CO ₃ ² -/HCO ₃ -
Não diluída	1+	1+
1:2	-	1+
1:4	-	-
1:8	-	-

3.4.4 Ensaio de LA Diluídas nas Soluções de Tampões PBS e CO₃²-/HCO₃⁻

As soluções de LA preparada nos tampões (PBS e CO₃²-/HCO₃-) foram diluídas (1:2 até 1:8) nos respectivos tampões de adsorção, para verificar até que faixa de diluição dessas soluções, se observaria reatividade, visando à utilização da solução de LA diluída.

As duas soluções geraram aglutinação 1+ até a diluição de 1:4, quando testadas com a amostra de soro não inativada, não diluída dos camundongos infectados experimentalmente. Entretanto, a diluição de 1:4 mostrou baixa quantidade de partículas, inviabilizando seu uso como solução de trabalho (tabela 5). Logo, a diluição de 1:2 da solução de partículas pôde ser adotada.

Tabela 5 - Padrões de aglutinação obtidos no ensaio de LA diluído em seus respectivos tampões de adsorção (PBS e CO₃²/HCO₃-), utilizando soro de camundongo não inativado e não diluído.

Diluição da solução LA PBS e CO ₃ ²⁻ /HCO ₃ -	Amostra de soro	Padrão de aglutinação
1:2	Não diluída	1+
1:4	Não diluída	1+
1:8	Não diluída	-

Na amostra de soro inativada, não diluída dos camundongos experimentalmente infectados foi observado padrão de aglutinação 1+ até a diluição de 1:4 da solução de partículas em tampão CO₃²-/HCO₃- (tabela 6). Contudo, quando

esta amostra foi testada com a solução de PBS diluída, não houve reatividade dessa amostra de soro.

Tabela 6 - Padrões de aglutinação obtidos no ensaio de LA diluído em seus respectivos tampões de adsorção (PBS e CO₃²⁻/HCO₃-), utilizando soro de camundongo inativado e não diluído.

	Padrão de aglutinação		
Diluição da solução LA —	PBS	CO ₃ ² -/HCO ₃ -	
1:2	-	1+	
1:4	-	1+	
1:8	-		

Devido à solução preparada com PBS apresentar limitações técnicas quanto aos parâmetros técnicos, como formação de pellet de partículas na borda do frasco, dificuldade de suspensão durante o ensaio de acoplamento, bem como formação de precipitados na alíquota depositada sobre a lâmina de vidro, além de inferior reatividade com o soro controle positivo (animais infectados) citada anteriormente, adotou-se para o teste com soro de pacientes diagnosticados previamente com PCM, a solução preparada com tampão de adsorção CO_3^2 -/HCO $_3$ - como ideal neste trabalho. Isto devido não se observar as limitações técnicas descritas para a solução de PBS.

A partir desta constatação, os demais testes, com soro de pacientes diagnosticados com PCM e outras infecções fúngicas, bem como aqueles indivíduos tidos como saudáveis, foram testados com a solução e LA diluído 1:2 em tampão CO_3^{2-}/HCO_3^{-} (Paracoccilatex). Além disso, sua aplicabilidade foi confirmada, testando-se soro de um paciente com PCM na forma aguda, cujo resultado do teste de ID foi positivo até a diluição do soro de 1:16. Neste ensaio, a observação de aglutinação (1+) foi possível até a diluição de 1:4 do soro não inativado e 1:2 do soro inativado deste paciente, resultados ilustrados nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 - Padrões de aglutinação obtidos com amostra de soro PCM não inativado após teste com Paracoccilatex (LA/ CO₃²·HCO₃⁻).

Amostra de soro	Padrão de aglutinação
Não diluída	1+
1:2	1+
1:4	1+
1:8	y -

Tabela 8 - Padrões de aglutinação obtidos com amostra de soro PCM inativado após teste com Paracoccilatex (LA/ CO₃²-HCO₃⁻).

Amostra de soro	Padrão de aglutinação
Não diluída	1+
1:2	1+
1:4	-
1:8	-

3.5 ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO PASSIVA COM PARACOCCILATEX EM AMOSTRAS SORO

3.5.1 Dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes com PCM

Um total de 51 amostras de soros de pacientes diagnosticados previamente por exame direto e/ou ID foram testados. Destes, 33 foram provenientes da demanda espontânea do Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas e, 18 provenientes de região endêmica, cedidos pelo professor Dr. Zoilo Pires de Camargo.

A média de idade dos pacientes foi de 44 anos, sendo 92,16% (47/51) do sexo masculino, e a maioria residente em áreas rurais do país (94,12%; 48/51). Quanto à forma clinica da PCM, a forma crônica foi a mais freqüente, sendo observada em 88,24% (45/51) dos pacientes, dos quais 51,11% (23/45) apresentavam a forma crônica multifocal e 48,89% (22/45) a forma unifocal. A forma aguda foi observada em 11,76% (6/51) dos pacientes participantes do trabalho. A

tabela 9 resume as principais características epidemiológicas dos pacientes com PCM. No que se refere à ocupação, 72,55% (37/51) dos pacientes exerciam alguma atividade relacionada ao campo, enquanto 27,45% (14/51) exerciam atividades afins, ou seja, que não tinham contato direto com lavouras, etc.

Tabela 9 - Principais dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com PCM.

Média de idade (anos)	Sexo n (%)		Forma clínica n (%)		
	Masculino	Feminino	Aguda	Crô	nica
44	47	04	06	45 (88,24)	
77	(92,16)	(7,84)	(11,76)	Unifocal	Multifocal
				22 (48,89)	23 (51,11)

O diagnóstico prévio destes pacientes foi dado pelo exame direto (7,84%; 4/51), sorologia baseada no este de ID (49,02%; 25/51), bem como pela combinação da observação da levedura multibrotante no espécime clínico (exame direto - ED) e confirmação pelo sorodiagnóstico (43,14%; 22/51). A figura 8 ilustra a distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico.

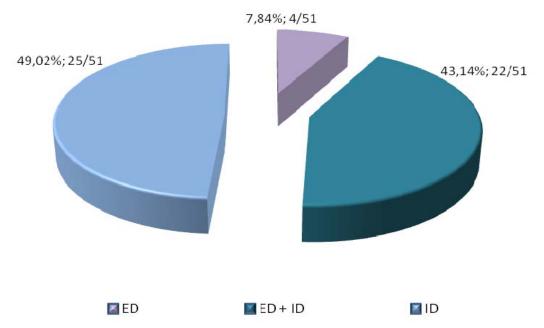


Figura 8 – Distribuição dos pacientes de acordo com o tipo de diagnóstico para PCM. ED, exame Direto; ID, Imunodifusão.

A ID foi positiva em 92,16% (47/51) das amostras de soro desses pacientes, demonstrando linhas de precipitação desde a amostra não diluída até a diluição de 1:1024. Somente 7,84% (4/51) das amostras foram negativas neste ensaio, sendo estes pacientes diagnosticados como tendo PCM por meio de exame direto de amostra clínica (raspado de lesão). A figura 9 mostra a distribuição dos títulos observados nas amostras de soro de pacientes com PCM testadas pelo ensaio de ID.

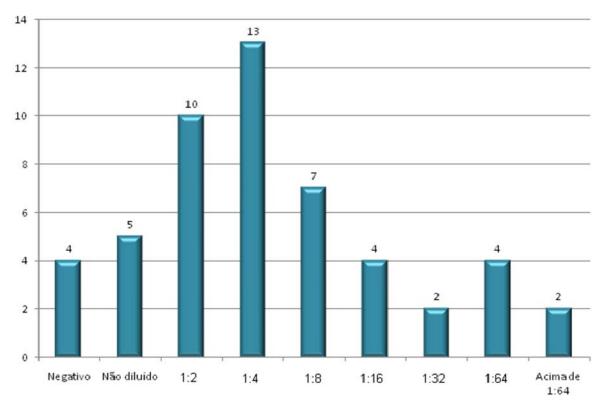


Figura 9 - Distribuição dos resultados do teste de ID de pacientes com PCM.

Não houve relação estatisticamente significante entre diagnóstico da PCM dado pelo teste de ID e, as formas clínicas da doença, o sexo do paciente, bem como a ocupação. As tabelas 10, 11 e 12 demonstram a relação destes dados.

Tabela 10 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM gerado pelo teste de ID de acordo com as formas clínicas da doença.

ID	Formas clínicas		Total
	Aguda	Crônica	
Positivo	06	41	47
Negativo	00	04	04
Total	06	45	51

Teste G: 1,0456; p = 0,3065

Tabela 11 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM gerado pelo teste de ID
de acordo com o sexo dos pacientes.

ID	Sexo		Total
·	Masculino	Feminino	
Positivo	44	03	47
Negativo	03	01	04
Total	<i>A</i> 7	04	51

Teste G: 1,2298; p = 0,2674

Tabela 12 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM gerado pelo teste de ID de acordo com a ocupação dos pacientes.

ID	Ocupação		Total
_	Agrícola	Afins	
Positivo	34	13	47
Negativo	03	01	04
Total	37	14	51

Teste G: 0,0133; p = 0,9081

3.5.2 Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com PCM Utilizando Paracoccilatex

No ensaio de aglutinação com Paracoccilatex, observou-se reatividade de 84,31% (43/51) das amostras de soro de pacientes com PCM, não se observando aglutinação em 15,69% (8/51).

A figura 10 ilustra a reatividade dos pacientes frente ao Paracoccilatex.

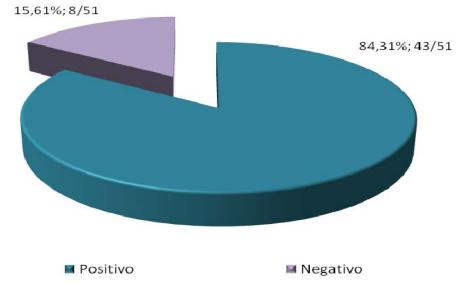


Figura 10 – Distribuição dos pacientes com PCM de acordo com a reatividade no LA (Paracoccilatex).

Os padrões de aglutinação observados variaram de 1+ (formação de grumos grosseiros imersos em solução turva) até 4+ (formação de grumos bem definidos, agrupados de forma centralizada, imersos em solução límpida) no teste com amostras de soro não diluídas. Sendo assim, 39,54% (17/43) revelaram padrão de aglutinação 1+. Os padrões de aglutinação 2+ e 3+ foram observados com percentuais de 18,60% (8/43) cada. O padrão 4+ foi obtido em 23,26% (10/43) das amostras reativas testadas.

A figura 11 ilustra o resultado de uma observação de aglutinação padrão 4+ e o resultado negativo (branco).

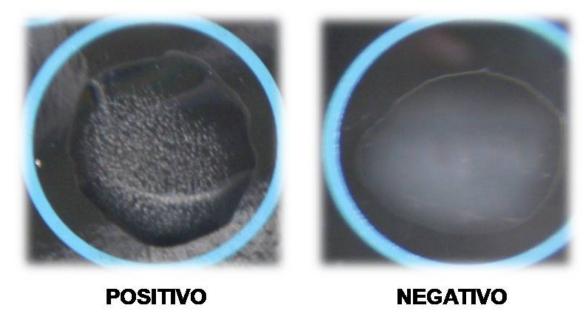


Figura 11 – Resultados obtidos com Paracoccilatex em caso positivo (4+) e negativo.

A figura 12 ilustra a freqüência dos padrões de aglutinação observados com o soro de pacientes com PCM.

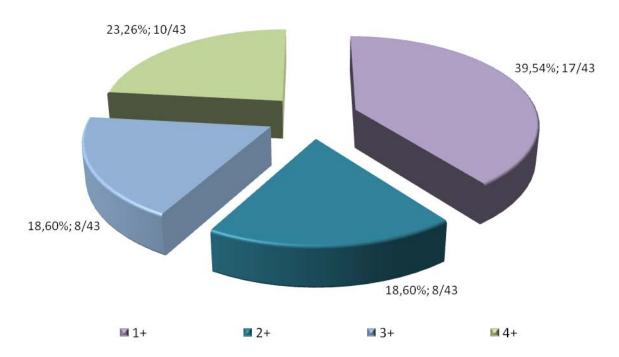


Figura 12 – Frequência dos padrões de aglutinação observados nas amostras de soro não diluídas reativas no ensaio de LA.

Como foi citado anteriormente 15,69% (8/51) das amostras de soro de pacientes com PCM não foram reativas no ensaio de LA com Paracoccilatex. Quatro (04) amostras de soro produziram traços de reatividade, sendo então obtidos resultados sólidos em relação à aglutinação caracteristicamente positiva, mediante a diluição destas amostras à 1:2 em solução salina 0,85%. Portanto, uma (01) amostra produziu padrão 1+, duas (02) amostras produziram padrão 2+ e, uma amostra produziu padrão 3+. Esses resultados foram computados em amostras reativas na diluição 1:2, tendo em vista que amostras com padrões de aglutinação acima de 1+ foram diluídas a fim de inferir a permanência dos padrões de aglutinação dessas amostras. Logo, quando amostras de soro que apresentaram elevados padrões de aglutinação padrões de aglutinação foram diluídas, observou-se regressão dos padrões de aglutinação paralelamente às faixas de diluição.

De acordo com a amostra de soro, obteve-se que 29,41% (15/51) foram amostras reativas quando não diluídas, 9,80% (5/51) foram reativas com amostra não diluída e mantiveram reatividade até a diluição 1:2. A permanência de reatividade até a diluição 1:4 foi observada em 5,88% (3/51). Foram observada

permanência de reatividade nas diluições de 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64 em 9,80% (5/51), 7,84% (4/51), 17,65% (9/51) e 3,92% (2/51), respectivamente. Não houve permanência de aglutinação acima da diluição de 1:64.

A figura 13 ilustra a freqüência da reatividade das amostras não diluídas e diluídas, bem como aquelas não reativas. Das amostras não reativas, quatro (04) corroboraram com o sorodiagnóstico negativo obtido no teste de ID, sendo estes pacientes apenas diagnosticados pelo exame direto. As outras quatro (04) amostras não reagiram no ensaio de aglutinação, mas no teste de ID foram positivas, com linhas de precipitação sendo observadas desde a amostra não diluída à diluição de 1:2.

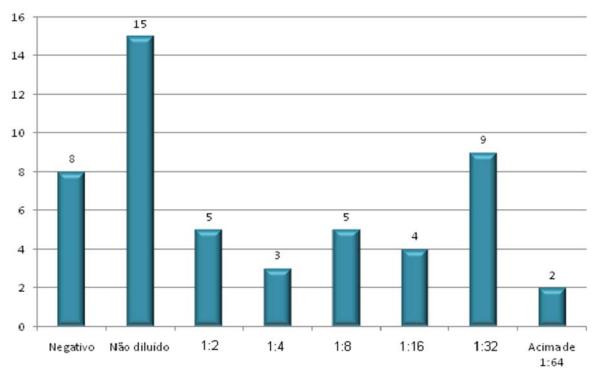


Figura 13 – Distribuição dos resultados do teste de LA de pacientes com PCM.

Não houve relação estatisticamente significante entre o sorodiagnóstico gerado pelo Paracoccilatex e as formas clínicas da doença, sexo e ocupação dos pacientes. As tabelas 13, 14 e 15 demonstram a relação desses dados.

Tabela 13 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM gerado pelo teste de LA (Paracoccilatex) de acordo com as formas clínicas da doença.

LA _	Forma clínica		Total
	Aguda	Crônica	
Positivo	06	37	43
Negativo	00	08	08
Total	06	45	51

Teste G: 2,1913; p = 0,1388

Tabela 14 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM gerado pelo teste de LA (Paracoccilatex) de acordo com o sexo dos pacientes.

LA	Sexo		Total
- -	Masculino	Feminino	
Positivo	41	02	43
Negativo	06	02	08
Total	47	04	51

Teste G: 2,8669; p = 0,0904

Tabela 15 - Comparação do sorodiagnóstico para PCM gerado pelo teste de LA (Paracoccilatex) de acordo com a ocupação dos pacientes.

LA _	Ocupação		Total
	Agrícola	Afins	•
Positivo	32	11	43
Negativo	05	03	08
Total	37	14	51

Teste G: 0,4573; p = 0,4989

O teste de LA com Paracoccilatex no sorodiagnóstico da PCM, mostrou-se tão eficaz quanto o teste sorológico amplamente executado na atualidade por laboratórios de referência, a imunodifusão dupla (Tabela 16), ressaltando sua aplicabilidade.

Tabela 16 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM gerado pelos ensaios de ID e LA (Paracoccilatex).

Resultado	ID	LA
Positivo	47	43
Negativo	04	08
Total	51	51

 χ^2 = 1,511; p = 0,3566

3.5.3 Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com Outras Infecções Fúngicas Utilizando Paracoccilatex

5.5.3.1 Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com Aspergilose

Foram testadas 15 amostras de soro de pacientes com aspergilose, sendo estes previamente diagnosticados sorologicamente pelo teste de ID utilizando exoantígeno bruto de *Aspergillus fumigatus*. Das 15 amostras, cinco (05) eram provenientes da demanda espontânea do Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas e, 10 foram cedidas pelo professor Dr. Zoilo Pires de Camargo (UNIFESP).

No ensaio de LA com o Paracoccilatex, 73,33% (11/15) foram negativas e 26,67% (4/15) foram reativas no ensaio. Duas amostras produziram padrão de aglutinação 2+ e as duas restantes exibiram padrão 1+. Foi possível testar as diluições de três amostras (uma com padrão 2+ e duas com padrão 1+). As diluições produziram padrão 1+, sendo a primeira somente reativa na diluição 1:2, e entre as demais, uma manteve o padrão até a diluição 1:4 do soro, enquanto a outra não foi reativa quando diluída.

A figura 14 ilustra a reatividade de amostras de soro de pacientes com aspergilose no ensaio de LA com o Paracoccilatex.

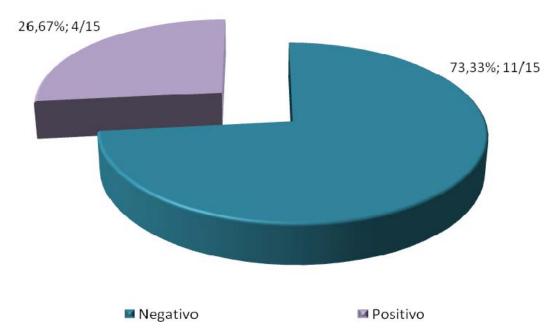


Figura 14 - Reatividade de amostras de soro de pacientes com aspergilose no ensaio de LA com Paracoccilatex.

3.5.3.2 Ensaio de LA em Amostras de Soro de Pacientes com Histoplasmose

Foram testadas 11 amostras de soro de pacientes com histoplasmose, diagnosticados previamente pelo teste de ID. Seis amostras foram provenientes da demanda espontânea do Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas e cinco, cedidas pelo professor Dr. Zoilo Pires de Camargo (UNIFESP).

Quando testadas no ensaio de LA com Paracoccilatex, 72,73% (08/11) das amostras foram negativas e 27,27% (03/11) foram positivas. Das três amostras positivas no LA, duas produziram padrão de aglutinação 2+, enquanto que uma demonstrou padrão 3+. Foi possível testar as diluições de somente uma amostra de soro reativa (proveniente do Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas), cuja aglutinação foi padrão 2+, sendo que este padrão permaneceu na diluição 1:2 e regrediu na diluição de 1:4.

A figura 15 ilustra a reatividade de amostras de soro de pacientes com histoplasmose no ensaio de LA com Paracoccilatex.

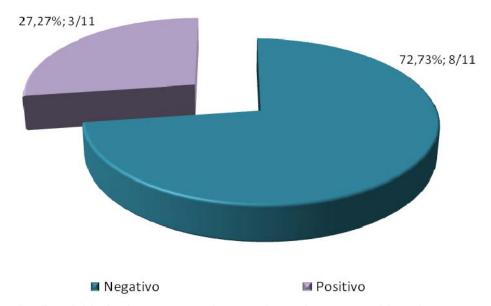


Figura 15 – Reatividade de amostras de soro de pacientes com histoplasmose no ensaio de LA com Paracoccilatex.

3.5.4 Ensaio de LA em Amostras de Soro de Indivíduos com Outras Infecções Não Fúngicas Utilizando Paracoccilatex

Foram testadas 49 amostras de soro de pacientes com outras doenças não fúngicas. Estas amostras eram advindas da demanda espontânea do Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas. Essas amostras deram entrada para investigação sorológica, mas foram negativas no teste de ID para PCM, histoplasmose e aspergilose.

No ensaio de LA com Paracoccilatex, 77,55% (38/49) foram negativos e 22,45% (11/49) foram positivos. A figura 16 ilustra a reatividade de amostras de soro de indivíduos sem infecção no ensaio de LA com Paracoccilatex.

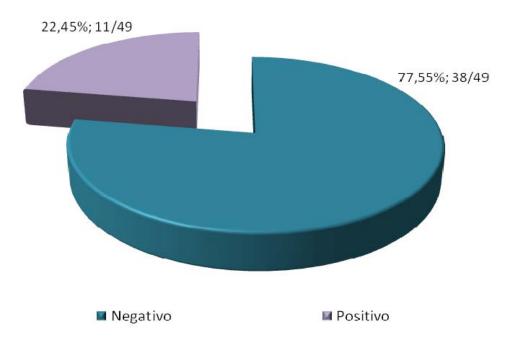


Figura 16 – Reatividade de amostras de soro de indivíduos sem infecção no ensaio de LA (Paracoccilatex).

O ensaio de LA foi apto em produzir o sorodiagnóstico da PCM, pois é capaz de gerar resultados fidedignos em amostras de soro com diagnóstico de infecção por *P. brasiliensis*, quando comparado a amostras de soro de pacientes com etiologias diversas.

3.5.5 Ensaio de LA em Amostras de Soro Humano Normal Utilizando Paracoccilatex

Foram testadas 20 amostras de soro de indivíduos sem qualquer tipo de infecção. Nenhuma das amostras testadas mostrou reatividade com o Paracoccilatex.

A tabela 17 mostra a comparação dos resultados obtidos com ensaio de LA com Paracoccilatex, em amostras de soro de pacientes com PCM em relação ao soro humano normal.

Tabela 17 - Comparação do resultado do sorodiagnóstico para PCM gerado pelos ensaios de LA (Paracoccilatex) em amostras de soro de pacientes com PCM e amostras de soro humano normal.

LA	PCM	SHN
Positivo	43	00
Negativo	08	20
Total	51	20

 $[\]chi^2$ = 42,759; p < 0,0001; **SHN-** soro humano normal

3.5.6 Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos do ensaio de LA (Paracoccilatex) e Grau de Concordância entre LA e ID

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do ensaio de LA foram de 84,31%, 81,05%, 70,49% e 90,59%, respectivamente.

O grau de concordância entre os ensaios de LA e ID, empregando a relação definida o Martins *et al.* (1995), foi de 92,16%.

4 DISCUSSÃO

Pesquisas têm sido aplicadas para elucidar a patogênese da PCM, principalmente no que se refere às moléculas responsáveis pela evasão do fungo do sistema imunológico do hospedeiro humano, causa pela qual a doença se caracteriza como crônica. Neste ponto, o diagnóstico precoce tem papel fundamental para o bom prognóstico do paciente com suspeita clínica de infecção pelo *P. brasiliensis*. Nenhum teste diagnóstico é superior ao isolamento do fungo a partir de espécimes clínicos ou a visualização da levedura multibrotante nestes. Entretanto, como nem sempre isto é possível, métodos sorológicos baseados na pesquisa de anticorpos ou antígenos são de grande valia para se obter o diagnóstico precoce, bem como ao seguimento sorológico depois de implantada a terapia antifúngica (CAMARGO & FRANCO, 2000).

A partir da identificação das principais proteínas excretadas pelo fungo em meios de cultura líquido (PUCCIA et al. 1986), bem como do reconhecimento dessas proteínas pelo soro de paciente com PCM por immunoblotting (BLOTTA & CAMARGO, 1993), teve-se como recomendar a melhor maneira de se obter uma preparação antigênica contendo proteínas de interesse em uma quantidade significante, possível de gerar bons resultados quando empregada em um teste sorológico (CARMAGO et al., 2003).

Atualmente, a metodologia sorológica mais difundida ao sorodiagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla (ID), utilizando principalmente exoantígeno bruto derivado da forma leveduriforme de *P. brasiliensis* (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Porém, a técnica é restrita a centros de pesquisa e referência, necessitando sempre de profissionais habilitados para realizar o teste.

No presente estudo, optou-se pela elaboração de um teste sorológico baseado em aglutinação passiva, utilizando-se uma solução 1% de partículas de látex, sensibilizadas com o mesmo tipo de preparação antigênica aplicado no teste de ID, exoantígeno bruto derivado da forma leveduriforme do *P. brasiliensis*. A

escolha da técnica foi devida a sua rápida e fácil execução, obtendo-se o resultado em até 10 minutos.

Os isolados fúngicos utilizados no presente estudo, para obter exoantígeno bruto, produziram preparações antigênicas constituídas de quantidades relevantes de glicoproteínas, cujas concentrações variaram entre 760 e 1520 μg/mL. O perfil protéico dos lotes obtidos foi bastante variado e as duas proteínas imunodominantes no sistema-*P. barsiliensis*, gp43 e gp70, estiveram presentes, bem como proteínas de massa molecular inferiores, também reconhecidos amplamente por anticorpos anti-*P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989; ORTIZ *et al.*, 1998; MATTOS-GROSSO *et al.*, 2003). O pool de exoantígenos aplicado no ensaio de acoplamento de partículas de látex, obtido pela homogeneização de quantidades equivalentes de cada lote de exoantígeno bruto, constituiu-se boa quantidade de proteínas (1570 μg/mL), contendo rico perfil protéico. Além das proteínas de interesse, outras proteínas foram observadas somente no pool, as de massa molecular 65, 47 e 35 kDa, provavelmente devido à formação de quantidades detectáveis após a mistura de preparações nas quais se apresentavam como traços.

Em nossa pesquisa, pool de exoantígenos foi testado no ensaio de ID com soro hiper-imune produzido em coelhos, verificando-se reatividade a partir da amostra de soro não diluída até a diluição de 1:32, justificando-se sua possível utilização na sensibilização das partículas de látex, bem como no ensaio de LA.

A seleção das partículas de látex neste trabalho para o desenvolvimento da metodologia, quanto à natureza e dimensão (poliestireno, medindo 0,8 μm de diâmetro), justifica-se pelo amplo emprego em ensaio baseados na aglutinação passiva, tanto no sorodiagnóstico de infecções fúngicas (criptococose, candidíase, aspergilose), quanto nas infecções derivadas de agentes não fúngicos, como por exemplo, bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), protozoários (Leishmaniose) e vírus (KAMI *et al.*, 2000; MISAKI *et al.*, 2003; DEWAR *et al.*, 2005; SUNDAR *et al.*, 2005; TANEJA *et al.*, 2006; WEIST *et al.*, 2006; SAHA *et al.*, 2008).

No que se refere à relação massa de partículas e o volume da solução adotada, uma concentração 1% constituída de 10 mg de esferas de poliestireno em um volume total de 1 mL, foi mais do que suficiente para produzir um ensaio com resultados expressivos. Partindo-se de soluções mais ou menos concentradas (em partículas), a leitura do teste se torna duvidosa, tendo em vista a exacerbada formação de precipitados no momento de realizar o teste, ou a escassez das mesmas, respectivamente. Tais parâmetros inviabilizam não somente a leitura, mas também a confiabilidade do resultado obtido.

Os ensaios baseados em aglutinação passiva de partículas de látex (LA) relatados até hoje, não descrevem os detalhes do procedimento, dissertando apenas as proporções antígeno e partículas para obtenção da solução de trabalho. Contudo, essa relação pode variar de acordo com o agente etiológico estudado, devido à composição antigênica derivada do mesmo, o que sugere uma consequente variação nos ensaios de acoplamentos direcionados ao diagnóstico por LA em diversas infecções (BLUMER, 1973; DEE et al., 1981; HOPWOOD et al., 1985; DESAKORN et al., 2002). Observa-se também, por exemplo, no diagnostico sorológico por LA para criptococose, o qual a partir da assertiva de que a pesquisa de anticorpos circulantes não determina o diagnóstico da doença, anticorpos (policlonais ou monoclonais) são os substratos indicados para este fim, detectandose assim os antígenos circulantes liberados pelo fungo no organismo do hospedeiro (KAUFMAN & BLUMER, 1968; TEMSTET et al., 1992). Sendo assim, o que ocorre é a padronização, individualmente pré-estabelecida, dos ensaios a desenvolver-se.

No presente estudo, optou-se pela investigação de duas soluções, para servirem como tampão de adsorção no ensaio de acoplamento, obtendo-se ao final a solução de trabalho capaz de gerar resultados de LA ótimos com soro de pacientes previamente diagnosticados com PCM. Essas soluções foram escolhidas com base na faixa de potencial hidrogeniônico (pH) que, teoricamente, aproximavam-se do ponto isoelétrico (pl) das proteínas presentes na preparação antigênica (pool de exoantígenos brutos). Os tampões empregados foram PBS pH 7.4 e CO₃²-/HCO₃- pH 9.2. Durante o desenvolvimento do ensaio de acoplamento, especificamente nas etapas de suspensão do material após centrifugação, pôde-se

verificar a formação de precipitados difíceis de serem homogeneizados, quando da tentativa de suspensão do material, com a solução de PBS pH 7.4.

Acredita-se que limitações intrínsecas ao sistema de reação, contato do poliestireno com o ambiente fosfatado, influencie na formação desses precipitados. Talvez por este motivo os ensaios de LA relatados na literatura, que citam o tampão de adsorção utilizado na sensibilização, não empreguem PBS. Nestes trabalhos observa-se o emprego de tampões de natureza salina, quimicamente constituídos principalmente de glicina (KAUFMAN & BLUMER, 1968; STICKLE *et al.*, 1972; MERZ *et al.*, 1977; BLUMER *et al.*, 1973; KAUFMAN *et al.*, 1996), mas outros substratos e/ou elementos podem ser observados, como por exemplo, sais de boro (GERBERT *et al.*, 1972). Quanto às faixas de pH adotadas, ressalta-se novamente, devem ser adequadas ao substrato de trabalho para diminuir possíveis influências no sistema de reação. Com base nesses argumentos, o tampão CO₃²/HCO₃- pH 9.2 foi eleito para utilização na solução LA de trabalho.

Além das limitações observadas durante o ensaio de acoplamento do presente estudo, o tampão PBS pH 7.4 gerou o mesmo tipo de limitação durante o teste piloto de LA com amostras de soro de camundongos infectados experimentalmente. Apesar da obtenção do mesmo padrão de aglutinação (1+) visto entre as soluções não diluídas (PBS pH 7.4 e CO₃²⁻/HCO₃- pH 9.2), a formação de precipitados durante o teste de LA foi o ponto crítico para a invalidez deste tampão neste trabalho. Paralelamente, quando as soluções de trabalho derivadas dos dois tampões foram diluídas, observou-se que aquela derivada do tampão PBS pH 7.4 não gerou aglutinação. Neste processo, a solução derivada do tampão CO₃²⁻/HCO₃- pH 9.2 produziu aglutinação 1+ até a diluição de 1:4, frente à amostra de soro não diluída e não inativada de camundongos experimentalmente infectados. Entretanto, a diluição 1:2 foi adotada pela produção de visualização ideal do padrão de aglutinação.

A observação dos variados padrões de aglutinação neste trabalho, de 1+ a 4+, foi somente obtida quando as amostras de soro de pacientes previamente diagnosticados com PCM foram testadas pelo ensaio com LA utilizando o tampão CO_3^2 -/HCO $_3$ - pH 9.2 (Paracoccilatex), sendo as amostras de soro não diluídas. O fato

de não se obter variação no padrão de aglutinação com soro de animais infectados e a obtenção com soro de pacientes, deve-se ao fato de que estes pacientes tiveram diagnóstico sorológico pela ID, com anticorpos sendo detectados a títulos variando entre 1:2 a 1:1024, enquanto que a detecção de anticorpos na amostra de soro dos camundongos infectados experimentalmente foi obtida somente na amostra de soro não diluída.

A baixa produção de anticorpos nos animais infectados intraperitonialmente com leveduras de *P. brasiliensis*, justifica-se por uma possível resistência intrínseca da linhagem de camundongos utilizada (Swiss) ao desenvolvimento da PCM. Calich et al. (1985), determinaram que as linhagens de camundongo B10.A, B10D2/oSn e B10D2/nSn são susceptíveis ao desenvolvimento de PCM ao serem infectados por leveduras de P. brasiliensis, confirmado pelo elevado nível de anticorpos circulantes; esses níveis são diferenciados, exponencialmente, daqueles produzidos por linhagens resistentes a partir da 12ª semana pós infecção (SINGER-VERMES et al., 1993). Em contrapartida, camundongos Swiss foram utilizados para infecção experimental para verificar a resposta in vivo e in vitro de um produto composto por substâncias homeopáticas (Canova®), difundido nas terapias em indivíduos imunodeprimidos (câncer e AIDS), para evidenciar que mudanças ocorrem na evolução da PCM experimental. Os níveis de anticorpos dos animais infectados foram detectáveis a partir da 6ª semana após a infecção (TAKAHACHI et al., 2006). Esses dados corroboram com o observado pelo presente trabalho, no qual uma fraca resposta foi obtida no segundo mês após infecção.

Alguns autores relatam que o diagnóstico de LA conclusivo é gerado após a obtenção de determinado padrão de aglutinação produzido com amostras de soro previamente diluídas (BLUMER *et al.*, 1973; RESTREPO & MONCADA, 1978; KAUFMAN *et al.*, 1996). Contudo, o presente trabalho não especificou esse tipo de critério até o momento, devido ao fato de que os padrões de aglutinação foram obtidos com amostras de soro de pacientes sabidamente com PCM e não de amostras com apenas suspeita de infecção fúngica. Futuramente, com a delimitação das causas de reações falso-negativas, tais parâmetros descrever-se-ão.

Por outro lado, fatores relevantes à virulência das cepas de *P. brasiliensis*, podem ter influenciado diretamente na baixa infectividade nesses animais. Sabe-se que depois de longo período de subseqüentes passagens em meio de cultura, a virulência dos isolados fúngicos tende a sofrer uma redução, mas a recuperação dos mesmos após passagem em animal restabelece a virulência (BRUMMER *et al.*, 1990; SVIDZINSKI *et al.*, 1999; MACORIS *et al.*, 2006). Tais fatores devem ter sido limitantes no que se refere à patogenicidade, pois em ensaio desenvolvido paralelamente em nosso laboratório não foi possível recuperar os isolados de *P. brasiliensis* dos órgãos destes animais (pulmões, baço e fígado). Entretanto, nos exoantígenos brutos obtidos no presente estudo a partir destes isolados, observouse quantidades relevantes de proteínas, cuja concentração do pool dessas preparações foi de 1570 μg/mL, sendo que gp43 e gp70 estavam presentes, preparação esta apta a ser empregada ao sorodiagnóstico da PCM.

As características epidemiológicas dos pacientes com PCM incluídos neste trabalho, tais como média de idade (44 anos), maior incidência sobre o sexo masculino (92,16%), elevada procedência da área rural do país (94,12%), cuja atividade em lidar diretamente com a lavoura foi intensamente observada (72,55%) e maior freqüência da forma crônica (88,24%), corroboram com inquéritos epidemiológicos das regiões com diferentes graus de endemicidade (BAGATIN, 1986; SILVA-VERGARA & MARTÍNEZ, 1998; BLOTTA et al., 1999; CERMEÑO et al., 2004; FORNAJEIRO et al., 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Os pacientes com PCM foram diagnosticados previamente pelo exame direto e/ou teste de ID. Apesar de as características epidemiológicas dos pacientes corroborarem com as descritas na literatura, quando características como sexo, ocupação e forma clínica foram comparados aos resultados obtidos pelo teste de ID, não houve significância estatística.

Dos 51 pacientes com PCM incluídos neste trabalho, 92,16% (47/51) foram diagnosticados sorologicamente pela ID, cujos títulos variaram de 1:2 a 1:1024 e, 7,84% (4/51) foram diagnosticados somente pelo exame direto. Estes pacientes foram testados pelo ID, teste sorológico este recomendado para compor o diagnóstico da PCM (RESTREPO, 1992), contudo se mostraram anérgicos, ou seja, não reativos. Anticorpos IgG são caracteristicamente produzidos a altos níveis em

ambas as formas clínicas da doença, sendo a mudança de subtipo direcionada para produção de anticorpos IgG2 na forma crônica (BLOTTA & CAMARGO, 1993; JUVENALI et al., 2001; MAMONI et al., 2002). A ausência de detecção de anticorpos pela ID nesses pacientes pode ser explicada pela baixa avidez de anticorpos IgG2 às frações de carboidrato da preparação antigênica adotada na ID, levando-se em consideração a natureza da preparação, um extrato bruto de proteínas, obtido do metabolismo da fase leveduriforme do fungo em meio de cultura líquido (NEVES et al., 2003). Pararlelamente são necessários testes sorológicos mais sensíveis que a ID (Western blotting e ELISA) para detectar estes anticorpos durante a forma crônica unifocal, isto por que, pacientes com lesões isoladas produzem baixos níveis de anticorpos (VIDAL et al., 2005). No presente trabalho, três dos quatro pacientes negativos na ID manifestaram a forma crônica unifocal. O pacientes negativo na ID, que produziu a forma crônica, pode fazer parte de um baixo percentual de indivíduos que desenvolvem a PCM de forma severa, mas a sorologia se mostra atípica, marcada por sucessivos resultados negativos devido ao direcionamento da resposta de anticorpos ser produzida para outras frações antigênicas que não gp43 e gp70, impedindo a obtenção de resultado positivo como consequência da maioria das preparações antigênicas possuírem proteínas de baixa massa molecular ou massas moleculares acima de70 kDa em baixas concentrações (SOUZA et al., 1997; VIDAL et al., 2005).

No nosso ensaio de LA com Paracoccilatex, das 51 amostras de soro de pacientes com PCM 84,31% (43/51) mostraram reatividade pela observação de aglutinação de partículas de látex, em padrões de aglutinação que variaram de 1+ a 4+. Correntemente, diz-se que anticorpos aglutinantes são detectados no LA, tendo tamanho suficiente para produzir uma conexão entre partículas de látex acopladas com moléculas reconhecidas por estes anticorpos. Na sorologia de outras infecções, indica-se que anticorpos IgM são altamente associados a resultados de LA positivos, nos quais outras classes de anticorpos, tais como IgG, IgA e IgD, não seriam capazes produzir conexões efetivas entre partículas sensibilizadas (BRONNIMANN & GALGIANI, 1989; PAPPAGIANIS & ZIMMER, 1990).

Em contrapartida, testes baseados na caracterização da resposta imunológica humoral durante o curso da PCM, tanto experimental como humana, demonstram

que anticorpos IgG são os alvos no diagnóstico da PCM, sejam eles baseados em precipitação de complexos imunes, ensaios imunoenzimáticos e, provavelmente nos ensaios de aglutinação, em função dos altos níveis produzidos no início da infecção, bem como pela permanência destes por longos períodos após iniciada terapia antifúngica (VAZ et al., 1992; VAZ et al., 1998; DEL NEGRO et al., 2000; PANUTO-CASTELO et al., 2003). Sendo assim, talvez por isso, anticorpos IgG sejam responsáveis pela ausência de uma relação uniforme entre os padrões de aglutinação (1+, 2+, 3+ ou 4+) obtidos com o LA e os títulos indicados no diagnóstico prévio pela ID.

Em ensaios de LA para detecção de antígenos em infecções fúngicas como a criptococose, candidíase e aspergilose, os anticorpos IgG são empregados na sensibilização das partículas e são capazes de comprovar 93%, 100% e 93% de casos suspeitos dessas infecções, respectivamente (TANNER *et al.*, 1994; KAUFFMANN-LACROIX *et al.*, 2001; MISAKI *et al.*, 2003).

Com a aplicação do Paracoccilatex, observou-se reatividade cruzada no presente estudo com amostras de soro de pacientes com aspergilose (26,67%; 4/15), histoplasmose (27,27%; 3/11) e outras infecções (22,45%; 11/49). Estes resultados sugerem a presença de similaridade antigênica entres os antígenos excretados por estes agentes, fúngicos ou não-fúngicos, culminando na produção de anticorpos que reconheçam as proteínas acopladas às partículas de látex. A reatividade cruzada é muito comum em testes sorológicos que se baseiam na detecção de anticorpos entre infecções fúngicas (YARZABAL, 1982). Mesmo no teste de ID, de conhecido valor diagnóstico, também pode ocorrer reatividade cruzada de antígeno de *P. brasilienses* com soro de pacientes com histoplasmose, aspergilose, candidíase, esporotricose e blastomicose, contudo a discriminação de linhas de precipitação de identidade é bem definida, evitando confusão no momento da interpretação do resultado obtido (BUECHNER et al., 1973; RESTREPO & MONCADA, 1974). Em testes de LA para infecções fúngicas como aspergilose, candidíase, criptococose, coccidioidomicose, que se utilizam da detecção de antígenos circulantes em espéciems clínicos, tais como líquido cefelorraquidiano, lavado broncoalveolar e soro, são produzidas reatividades cruzadas e, estes kits já são todos comercializados (GERBERT *et al.*, 1972; PHILLIPS *et al.*,1990; GADE *et al.*, 1991; MARTINS *et al.*, 1995; MACHETTI *et al.*, 1998).

Restrepo & Moncada (1978) elaboraram um teste de LA para ser usado no sorodiagnóstico da PCM. A preparação antigênica utilizada foi a paracoccidioidina, a qual é adotada atualmente em intradermoreações ao inquérito epidemiológico em áreas com suspeita de endemicidade (CERMEÑO et al., 2004). Essa preparação antigênica foi um tanto rústica, pois deriva do filtrado de cultura da forma leveduriforme, mantida em meio líquido Kelley's por um mês sob agitação. Sabe-se hoje que este tempo de crescimento da cultura de leveduras de P. brasiliensis, representa a fase de degradação das proteínas totais excretadas pelo fungo, portanto interferiu diretamente na qualidade do antígeno bruto obtido ao final, cuja concentração protéica foi de 250 µm/mL (RESTREPO-MORENO & SCHNEIDAU Jr, 1967; CAMARGO et al., 1988). No que se refere à constitutição, a paracoccidioidina posssui alto índice de açúcares, tais como glicose, arabinose e galactose. A partir desta preparação, depois de procedido o teste LA, detectou-se reação de aglutinação positiva em 69,5% dos soros de pacientes com caso comprovado de PCM (48/69). Os resultados considerados positivos no LA foram aqueles com alto padrão de aglutinação (3+ e 4+) quando o soro foi diluído previamente a 1:8. Essa obrigatoriedade pode ser devida à natureza da preparação antigênica utilizada, sendo que os soros devem ser diluídos para que os anticorpos direcionados aos epítopos de carboidrato, provavelmente em menor concentração, possam reconhecer essas frações na superfície de partículas sensibilizadas.

Logo, uma diferença fundamental, em relação ao presente trabalho, foi o emprego do exoantígeno bruto de P. brasiliensis, obtido do metabolismo de células leveduriformes, crescidas em meio de cultura quimicamente definido, o qual sabidamente produz uma preparação antigênica rica em antígenos imunodominantes, observadas durante o curso da doença (CAMARGO et al., 1988; CAMARGO et al., 2003). Tal diferença foi crucial para a obtenção de sensibiliadde de 84,31% no ensaio de LA apresentado em nosso trabalho. Não somente influenciando na detecção mais pronunciada dos casos de PCM comprovados, mas a especificidade aqui foi consideravelmente mais elevada (81,05%) quando comparada àquela obtida por RESTREPO & MONCADA (1978), 46,8% para soro de pacientes com histoplasmose, 34,3% para outras micoses e 18,5% para pacientes com tuberculose e doadores de sangue.

Em relação à reatividade cruzada, o presente trabalho mostrou que soros de pacientes com aspergilose (26,67%), histoplasmose (27,27%) e com outras infecções (22,45%) foram reativos. Entretanto, esses valores foram mais pronunciados no LA produzido por RESTREPO & MONCADA (1978), no qual a reatividade cruzada com soro de pacientes com histoplasmose foi de 33,3%, reatividade que se manteve a tiutlos ≥ 1:32. Paralelamente, a titulos < 1:32 a positividade dessas amostras foi mais acentuada (10/23). Com amostras de soro de pacientes com outras micoses (aspergilose, candidíase sistêmica, coccidioidomicose e esporotricose), a positividade foi intensa a títulos de 1:8-1:16 (11/14) e 8,3% mantiveram a positividade a títulos ≥ 1:32. Nos casos de infecção não-fúngica, foi observado reatividade cruzada com soro de pacientes com tuberculose (17/100) a títulos de 1:8-1:16 e 17,6% cuja reatividade foi mantida a títulos ≥ 1:32. Em nosso estudo com LA, amostras de pacientes com outras infecções que mostraram reatividade, após a diluição das amostras a reatividade foi mantida a títulos ≤1:4. Acredita-se que a diluição dessas amostras faça com que o excesso de anticorpos ligados inespecíficamente às proteínas acopladas nas partículas se desprenda, eliminado esse tipo de falsa-positividade. Não houve falso-positivos quando amostras de soro humano normal foram testadas, diferente do obtido em 1978, quando 20/100 amostras foram reativas a títulos de 1:8-1:16.

Como citado anteriormente, as reatividades cruzadas verificadas neste trabalho, entre soros de pacientes com outras infecções fúngicas, provavelmente se devem à similaridade antigênica entre estes agentes (*Histoplasma capsulatum*, e *Aspergillus* sp.) com *P. brasiliensis* (PUCCIA & TRAVASSOS, 1991a; TABORDA & CAMARGO, 1994). Uma solução para a diminuição ou eliminação dessa reatividade cruzada, entre agentes etiológicos de micoses, seria o tratamento do antígeno com metaperiodato de sódio, deglicosilação do mesmo, emprego de proteína purificada e/ou deglicosilada ou ainda, tratar a amostra com metaperiodato de sódio (PUCCIA & TRAVASSOS, 1991b; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 2008).

Os demais ensaios que utilizam LA no diagnóstico de infecções fúngicas, voltados para detecção de antígenos circulantes, demonstram que a inativaçãoa da amostra a 56°C por 30 minutos aliado à diluição previa, ou trataemnto com EDTA dimunue a produção de resultados falso-positivos, devido à inativação do fator reumatóide e dissolução de complexos imunes (KAUFMAN & BLUMER, 1968; PREVOST & NEWELL, 1978; ENG & PEARSON, 1981; MAESAKI *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 1995; BLUMER *et al.*, 1973; KAUFMAN *et al.*, 1996; DESARKORN *et al.*, 2002). O fator reumatóide (RF) é um anticorpo IgM presente no soro de pacientes com artrite reumatóide, o qual interfere diretamente em ensaios de LA, a partir da ligação inespecífica desses anticorpos às proteínas presentes nas partículas de látex, gerando falsa-positividade (OXENHANDLER *et al.*, 1977; JOHNSON & ROBERTS, 1974; BENNETT & BAILEY, 1971).

No ensaio de LA para o diagnóstico da criptococose, indica-se o tratamento da amostra, seja de soro ou líquido cefaloraquidiano (LCR), com pronase, aquecimento a 56°C por 30 minutos ou com metaperiodato de sódio, procedimentos capazes de aumenter a sensibilidade do teste (STOCKMAN & ROBERTS, 1983; GRAY & ROBERTS, 1988; HAMILTON et al., 1991; WHITTIER et al., 1994). Um fator interferente, o fluido sinerese (superfície de condensação), formado por resíduos de Agar aderidos à alça de platina e suspensos em material biológico a ser testado (LCR e LBA) pode gerar reações falso-positivas (ENGLER & SHEA, 1994). Entretanto este fator não pode ser atribuído como causa de falso-positivos em nosso trabalho, pois o trabalho utilizou somente amostras de soro no teste de LA. Blevins et al. (1995) indicaram a possibilidade de ocorrerem falso-positivos quando se reutilizam lâminas escuras higienizadas com desinfetantes e detergentes, isto pois, formam-se áreas de superfície deteriorada, onde se acumulam blocos de proteínas responsáveis pela falsa-positividade. No presente trabalho, as lâminas reutilizadas foram higienizadas como sugerido por BLEVINS et al. (1995) não haver interferência, utilizando-se alvejante diluído em água destilada.

Obteve-se no presente estudo 15,69% (8/51) de reações falso negativas no Paracoccilatex. Das 8 amostras falso-negativas 4 também foram negativas no ID. Tais casos podem ser justificados, como dito anteriormente, pela baixa avidez de anticorpos IgG ou pela atipia sorológica desses pacientes com a forma crônica

unifocal (NEVES et al., 2003). As quatro amostras restantes foram positivas na ID, cuja resposta foi positiva a baixos títulos (uma amostra no soro não diluído e três a 1:2). A negatividade dessas amostras no teste LA pode ser devida a presença de baixos níveis de anticorpos específicos às frações antigênicas acopladas às partículas de látex, sendo que este teste necessita níveis de anticorpos mais elevados que o teste de ID. Adicionalmente, há possibilidade de terem sido formados complexos imunes durante o período de armazenamento dessas amostras, culminando na perda de reatividade (VERWEIJ et al., 1995). Apesar do número maior de casos falso-negativos, a sensibilidade (84,31%) do LA foi aproximada à faixa de sensibilidade da ID, a qual está entre 85-90% (CAMARGO et al, 1988; DEL NEGRO et al., 1995). Em comparação aos testes de fixação de complemento e imunofluorescência indireta, o LA foi mais sensível, tendo em vista que estes testes têm valores de sensibilidade de 71,1% e 65,2%, respectivamente (DEL NEGRO et al., 1991). Além disso, o grau de concordância entre os ensaios, LA e ID, foi elevado (92,16%), ressaltando-se ainda mais o valor diagnóstico do ensaio de LA proposto. Entretanto, a especificidade do teste LA (81,05%) foi inferior à da ID, que pode chegar até 100% (MENDES-GIANNINI et al., 1994).

Futuramente, a partir dos resultados obtidos, será possível aperfeiçoar a técnica, moldando-a a fim de obter uma metodologia com a preparação antigênica ideal em quantidades satisfatórias, bem como ambiente de reação ideal a torná-la reprodutível em qualquer laboratório, seja ele de referência ou mesmo hospitalar. Medidas como o tratamento do exoantígeno, para eliminar a reatividade de epítopos de carboidrato, utilização de proteína purificada, podem futuramente auxiliar na obtenção de resultados mais específicos com ensaios utilizando partículas de látex, como foi observado em outros testes sorológicos (CAMARGO *et al.*, 1994; PUCCIA & TRAVASSOS, 1991b; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). Atualmente, a promessa de obtenção de testes com elevada sensibilidade e 100% específicos está no emprego de antígeno recombinante, qual dependendo do vetor utilizado para recombinação, gera proteínas de *P. brasiliensis* sem resíduos de carboidrato adicionais que interfiram no teste (DINIZ *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2008).

5 **CONCLUSÕES**

- A produção de exoantígeno bruto de *P. brasiliensis* a partir das cepas Pb34, Pb113 e PbIOC, baseando-se em técnica anteriormente descrita (CAMARGO *et al.*, 1988), possibilitou a obtenção de pool de exoantígenos brutos com perfil protéico bastante variado, bem como quantidade relevante de proteínas de interesse (1570 μg/mL).
- Foi possível obter soro de camundongos experimentalmente infectados com leveduras Pb113 de *P. brasiliensis* que quando submetidos ao teste piloto com partículas de látex sensibilizadas revelaram fraca reatividade (1+) com a solução de partículas sensibilizadas. Logo, faz-se necessário a utilização de linhagens de camundongos com susceptibilidade à infecção pelo fungo superior aos infectados neste trabalho.
- Observou-se que cerca de 200 µg de proteínas do pool de exoantígenos brutos de *P. brasiliensis* são necessárias para sensibilizar cerca de 10 mg/mL de partículas de látex. Desta forma, ensaios futuros que adotem a preparação antigênica de mesma natureza aqui utilizada, podem se basear na quantidade de proteínas para solução 1% de partículas exposta pelo presente estudo.
- O desenvolvimento de um teste de aglutinação passiva de partículas de látex (poliestireno, 0,8μm), sensibilizando-as com exoantígeno bruto de *Paracoccidioides brasiliensis* em tampão CO₃²⁻/HCO₃- pH 9.2 (1%), é útil no diagnóstico sorológico da Paracoccidioidomicose (PCM).
- O pré-denominado Paracoccilatex demonstrou uma sensibilidade de 84,31%, sendo capaz de produzir aglutinação em 43 de 51 amostras de soro de pacientes com PCM. Portanto, esse resultado ilustra a possibilidade de aplicação da metodologia no sorodignóstico da PCM; entretanto a confirmação virá depois de eliminados os fatores que interferem na sensibilidade, tais como reatividade cruzada e resultados falso-negativos.

- Os padrões de aglutinação observados em amostras de soro de pacientes com PCM variaram de 1+ a 4+, em títulos variando entre 1:2 e 1:64, demosntrando que anticorpos aglutinantes estão presentes em grandes quantidades no soro de pacientes com PCM.
- A especificidade do teste foi de 81,05%, devida à reatividade cruzada com amostras de soro de pacientes com aspergilose (26,67%), histoplasmose (27,27%), infecções não-fúngicas (22,45%). Vale ressaltar que essa reatividade cruzada é observada comumente no diagnóstico de outras infecções fúngicas, confirmando a necessidade de futuros experimentos que eliminem essas reações inespecíficas, o que poderá tornar o método mais espcífico.
- Valores preditivos para resultados positivos e negativos foram de 70,49% e 90,59%, respectivamente. Sendo assim, o teste potencialmente tende a gerar resultados fidedignos, principalmente no que se refere aos verdadeiros resultados negativos.
- O grau de concordância entre Paracoccilatex e a Imunodifusão dupla (metodologia amplamente empregada no diagnóstico da PCM) foi de 92,16%, evidenciando o elevado potencial diagnóstico do Paracoccilatex, tendo em vista a acentuda concordância de resultados positivos gerados nos dois testes.

6 **PERSPECTIVAS**

A partir dos resultados promissores obtidos, futuramente procedimentos serão direcionados com a intenção de elevar a sensibilidade e tornar a metodologia mais específica. Para isto, tratar-se-á o pool de exoantígenos brutos com metaperiodato de sódio, bem como as amostras testadas mediante inativação pelo calor (56°C por 30 minutos ou 100°C por 3 minutos), solução de EDTA 1 mM, pronase, observandose o comportamento da metodologia no referente à reatividade cruzada.

Paralelamente, um ensaio baseado em aglutinação de partículas de látex para verificar a antigenemia de pacientes com PCM será desenvolvido. Anticorpos anti-*P. brasiliensis* serão produzidos e acoplados às partículas. Este tipo de metodologia vem sendo aplicada com sucesso para antigenemia em infecções fúngicas (KAUFMAN *et al.*, 1996; DESAKORN *et al.*, 1999; DESAKORN *et al.*, 2002; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2003, 2004a,b; 2005, 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, C.F., MARQUES-DA-SILVA, S.H., CAMARGO, Z.P. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1944-1946, 2005.
- ARISTIZABAL, B.H., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infection and Immunity**, v. 66, v. 11, p. 5587-5591, 1998.
- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém, Brasília, Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, 2007.
- BAGAGLI, E., Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an area of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 505-512, 1998.
- BAGATIN, E. Inquérito epidemiológico com a paracoccidioidina na região de Sorocaba, Estado de São Paulo. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v. 61, n. 1, p. 5-8, 1986.
- BAIDA, H., BISELLI, P.J.C., JUVENALE, M., DEL NEGRO, G.M.B., MENDES-GIANNINI, M.J.S., DUARTE, A.J.S., BENARD, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form of paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 273-278, 1999.
- BASTOS, K.P., BAILÃO, A.M., BORGES, C.L., FARIA, F.P., FELIPE, M.S.S., SILVA, M.G., MARTINS, W.S., FIÚZA, R.B., PEREIRA, M., SOARES, C.M.A. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidoides brasiliensis* mycelium reveals novel an induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 29, 2007.
- BERNAD, G., HONG, M.A., DEL NEGRO, G.M., BATISTA, L., SHIKANI-YASUDA, M.A., DUARTE, A.J. Antigen-specific immunosupression in paracoccidoidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 54, n. 1, p. 7-2, 1996.
- BENARD, G., MENDES-GIANNINI, M.J., JUVENALI, M., MIRANDA, E.T., DUARTE, A.J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.** v. 175, n. 5, p. 1263-1267, 1997.

- BENETT, J.E. and BAILEY, J.W. Control for rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. **Amer. J. Clin. Pathol.** v. 56, p. 360-365, 1971.
- BERTINI, S., COLOMBO, A.L., TAKAHASHI, H.K., STRAUS, A.H. Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipis during the course of paracoccidioidomycosis treatment. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 2, p. 150-156,feb. 2007.
- BIALEK, R., IBRICEVIC, A., AEPIUS, C., NAJVAR, L.K., FOTHERGILL, A.W., KNOBLOCH, J., GRAYBILL, J.R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2940-2942, 2000a.
- BIALEK, R., IBRICEVIC, A., FOTHERGILL, A. BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blatomyces dermatitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3190-3193, 2000b.
- BLEVINS, L.B., FENN. J., SEGAL, H., NEWCOMB-GAYMAN, P., CARROLI, K.C. False-positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1674-1675, 1995.
- BLOTTA, M.H.S. and CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 3, p. 671-676, 1993.
- BLOTTA, M.H.S.L., MAMONI, R.L., OLIVEIRA, S.S., NOUÉR, S.A., PAPAIORDANOU, P.M.O., GOVEIA, A., CAMARGO, Z.P. Endemic regions of Paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 3, p. 390-394, 1999.
- BLUMER, S.O., KAUFMAN, L., KAPLAN, W., McLAUGHLIN, D.W., KRAFT, D.E. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotricosis. **Appl Environ Microbiol**, v. 26, n. 1, p. 4-8, 1973.
- BLUMER, S.O., JALBERT, M., KAUFMAN, L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 404-407, 1984.

- BORELLI, D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. *In:* Pan American Health Organization. Scientific Publication, 254: 59-64, 1972.
- BORGES-WALMSLEY, M.I., CHEN, D., SHU, X., WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **TRENDS in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRONNIMANN, D.A. and GALGIANI, J.N. Coccidioidomycosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 8, p. 466-473, 1989.
- BRUMMER, E., RESTREPO, A., HANSON, L.H., STEVENS, D.A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. **Mycophatologia**, v. 109, p. 13-17, 1990.
- BRUMMER, E., CASTAÑEDA, E., RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis an Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.
- BUECHNER, H.A., SEABURY, J.H., CAMPBELL, C.C., GEORGE, L.K., KAUFMAN, L., KAPLAN, W. The current status of serologic, immunologic and skin tests in the diagnosis of pulmonary mycosis. **Chest**, v. 63, p. 259-270, 1973.
- CADAVI, D., and RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v. 111, p. 121-133, 1993.
- CALCAGNO, A.M., NINO-VEGA, G., SAN-BLAS, F., SAN-BLAS, G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1733-1736, 1998.
- CALICH, V.L.G., SINGER-VERMES, L.M., SIQUEIRA, A.M., *et al.* Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Brit J Exp Path**, v. 66, p. 585-594, 1985.
- CAMARGO, Z.P., GUESDON, J.L., DROUHET, E., IMPROVISI, L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in paracoccidioidomycosis. Comparison with

- counterimmunoelectrophoresis and erythroimmunoassays. **Mycolpathologia**, v. 88, p. 31-37, 1984a.
- CAMARGO, Z.P., GUESDON, J.L., DROUHET, E., IMPROVISI, L. Magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 22, p. 291-299, 1984b.
- CAMARGO, Z.P., GUESDON, J.L., DROUHET, E., IMPROVISI, L. Titration of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* by erythro-immunoassay (EIA). **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 22, p. 73-77, 1984c.
- CAMARGO, Z.P., UNTERKIRCHER, C., DROUHET, E. Comparison between magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA and complement fixation test (CF) in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 24, p. 77-79, 1986.
- CAMARGO, Z.P., UNTERKIRCHER, C., CAMPOY, S.P., TRAVASSOS, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988.
- CAMARGO, Z.P., UNTEKIRCHER, C., TRAVASSOS, L.R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 27, p. 407-412, 1989.
- CAMARGO, Z.P., TABORDA, C.P., RODRIGUES, E.G., TRAVASSOS, L.R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, p. 31-38, 1991.
- CAMARGO, Z.P., GESZTESI, J.L., SARAIVA, E.C.O., TABORDA, C.P., VICENTINI, A.P., LOPES, J.D. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2377-2381, 1994.
- CAMARGO, Z.P. and FRANCO, M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, p. 41-48, 2000.
- CAMARGO, Z.P., BERZAGHI, 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.

- CANO, L.E., BRUMMER, E., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. An evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 24, p. 467-475, 1986.
- CANO, L.E. and RESTREPO, A. Preditive value of serologic tests in the diagnosis and follow up of patients with paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 29, p. 276-283, 1987.
- CARVALHO, K.C., VALLEJO, M.C., CAMARGO, Z.P., PUCCCIA, R. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastorisi* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 622-629, 2008.
- CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides* brasiliensis yeast form. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1188-1193, 1990.
- CASOTTO, M., PARIS, S., CAMARGO, Z.P. Antigens of diagnostic value in three isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, p. 243-253, 1991.
- CAVALCANTI, S.D.B., LEVI, J.E., DANTAS, K.C., MARTINS, J.E.C. Analysis of the genetic polymorphism of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides cerebriformis* "moore" by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and 28S ribosomal DNA sequencing *Paracoccidioides cerebriformis* revisited. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 47, n. 3, p. 119-123, 2003.
- CERMEÑO, J.R., HERNANDÉZ, I., CERMEÑO, J.J., GODOY, G., JOSEFINA-CERMEÑO, J., ORELLÁN, Y., BLANCO, Y., CABELLO, I., GUZMÁN, Y., ALCALÁ, F., GARCÍA, T., PENNA, S. Epidemiological survey of histoplasmine and paracoccidioidine skin reactivity in an agricultural área in Bolívar state, Venezuela. **Europan Journal of Epidemiology**, v. 19, p. 189-193, 2004.
- CHARBEL, C.E., LEVO, J.E., MARTINS, J.E.C. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA on serum samples from patients with paracoccidioidomycosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 219-222, 2006.
- CISALPINO, P.S., PUCCIA, R., YAMAUCHI, L.M., CANO, M.I.N., FRANCO DA SILVEIRA, J., TRAVASSOS, L.R. Cloning, characterization, and epitope

- expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4553-4560, 1996.
- CONTI DÍAZ, I.A. Point of view. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypotesis of 1989: present status and perspectives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 131-134, 2007.
- CORREA, M.M, BEDOYA, A.M., GUERRERO, M.P., MENDEZ, 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.
- CORREDOR, G.G., COSTA-O, J.H., PERALTA, L.A., DIEZ, S., ARANGO, M., McEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16, p. 216-220, 1999.
- COSTA, C.S., ALBUQUERQUE, F.C., ANDRADE, R.V., OLIVEIRA, G.C., ALMEIDA, M.F., BRIGIDO, M.M., MARANHÃO, A.Q. Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistence. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 390-408, 2005.
- CUNHA, D.A., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M., FELIPE, M.S.S., SALEM-IZACC, S.M., DEEPE Jr., G.S., SOARES, C.M.A. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 2, p. 374-377, 2002.
- DEE, T.H., JOHNSON, G.M., BERGER, C.S. Sensitvity, specificity, and predictive value of anti-Candida serum precipitin and agglutinin quantification: comparison of counterimmunoelectrophoresis and latex agglutination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 750-753, 1981.
- DEL NEGRO, G.M.B., GARCIA, N.M., RODRIGUES, E.G., CANO, M.I., 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. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 277-280, 1991.
- DEL NEGRO, G.M.B., BENARD, G., ASSIS, C.M., VIDAL, M.S.M., GARCIA, N.M., OTANI, C., SHIKANAI-YASUDA, M.A., LACAZ, C.S. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with gp43 antigens: report of two cases. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 33, p. 113-116, 1995.

- 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 test for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 37-46, 2000.
- DESAKORN, V., SMITH, M.D., WALSH, A.L., SIMPSON, A.J.H., SAHASSANANDA, D., RAJANUWONG, A., WUTHIEKANUN, V., HOWE, P., ANGUS, B.J., SUNTHARASAMAI, P., WHITE, N.J. Diagnosis of Penicillium marneffei infection by quantitation of urinary antigen using enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 117-121, 1999.
- DESAKORN, V., SIMPSON, A.J.H., WUTHIEKANUN, V., SAHASSANANDA, D., RAJANUWONG, A., PITISUTTITHUM, P., HOWE., P.A., SMITH, M.D., WHITE, N.J. Development and evaluation of rapid urinary antigen detection tests for diagnosis of penicilliosis marneffei. **Journal of Clincal Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3179-3183, 2002.
- DEWAR, J., BEER, M., ELLIOT, E., MONAISA, P., SEMENYA, D., STEELE, A. Rapid detection of rotaviruses are laboratories underestimating infection in infants? **SAMJ**, v. 95, n. 7, p. 494, 2005.
- DÍEZ, S., GÓMEZ, B.L., RESTREPO, A., HAY, R.J., HAMILTON, A.J. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 359-365, 2002.
- DÍEZ, S., GÓMEZ, B.L., McEWEN, J.G., RESTREPO, A., HAY, R.J., HAMILTON, A.J. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1536-1542, 2003.
- DINIZ, S.N., CARVALHO, K.C., CISALPINO, P.S., SILVEIRA, J.F., TRAVASSOS, L.R., PUCCIA, R. Expression of bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidoides brasiliensis*: immunological reactivity of recombinant fusion proteins. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1200-1204, 2002.
- DOOR, H.R., HOFWEGEN, H., HOELEWIJIN, R., GILIS, H., PEEK, R., WETSTEYN, J.C.F.M., GENDEREN, P.J.J., VERVOORT, T., GOOH, T. Use of rapid dipstick and latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of amebic liver abscess, amebic colitis and *Entamoeba histolytica* cyst passage. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4801-4806, 2005.

- DUPONT, B., IMPROVISI, L., PROVOST, F. Détection de galactomannane dans les aspergilloses invasives humaines et animals avec un test au latex. **Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.**, v. 19, p. 35-41, 1990.
- ENG, R.H.K. and PERSON, A., Serum cryptococcal antigen determination in the presence of rheumatiod factor. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 700-702, 1981.
- ENGLER, H.D. and SHEA, Y.R. Effect of potential interference factors on performance of Enzyme Immunoassay and Latex Agglutination Assay for cryptococcal antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2307-2307, 1994.
- FAVA NETTO, C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (Blastomicose sul-americana). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 21, p. 99-194, 1961.
- FELIPE, M.S.S., ANDRADE, R.V., ARRAES, F.B.M., NICOLA, A.M., MARANHÃO, A.Q., *et al.* Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24706-24714, 2005.
- FERREIRA, M.E.S., MARQUES, E.R., MALAVAZI, I., TORRES, I., RESTREPO, A., NUNES, L.R., OLIVEIRA, R.C., GOLDMAN, M.H.S., GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis and molecular studies on sulfur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Gen genomics**, v. 276, p. 450-463, 2006.
- FERREIRA, A.P., CORRÊA, T., CUNHA, R., MARQUES, M.J., MONTESAM, M.A., SOUZA, M.A., TEIXEIRA, H.C. Human serum antibody reactivity towards *Paracoccidioides brasiliensis* antigens treated with sodium metaperiodate. **Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 325-329, 2008.
- FERREIRA-DA-CRUZ, M.F., GALVÃO-CASTRO, B., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Sensitive immunoradiometric assay for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1202-1205, 1991.
- FIGUEROA, J.I., HAMILTON, A., ALLEN, M., HAY, R. Immunohistochemical detection of a novel 22- and 25-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using specie-specific monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 1566-1574, 1994.

- FIGUEROA, J.I., HAMILTON, A., ALLEN, M., HAY, R. 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.**, v. 89, p. 566-572, 1995.
- FILLER, S.G. AND SHEPPARD. Fungal invasion of normally non-phagocitic host cells. **Plos Phatogens**, v. 2, n. 12, p. 1099-1105, 2006.
- FORNAJEIRO, N., MALUF, M.L.F., TAKAHACHI, G., SVIDZINSKI, T.I.E. Paracoccidioidomycosis epidemiological survey using gp43 in two cities of northwestern region of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 191-193, 2005.
- FRANCO, M., MONTENEGRO, M.R., MENDES, R.P., MARQUES, S.A., DILLON, N.C., MOTA, N.G.M. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, p. 129-132, 1987.
- FREITAS-DA-SILVA, G. and ROQUE-BARREIRA, M.C. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 381-385, 1992.
- GADE, W., HINNEFELD, S.W., BABCOCK, L.S., GILLIGAN, P., KELLY, W., WAIT, K., GREER, D., PINILLA, M., KAPLAN, R.L. Comparison of the PREMIER cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the látex agglutination assay for detection of crytococcal antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 1616-1619, 1991.
- GARCIA, N.M., DEL NEGRO, G.M.B., MARTINS, H.P., LACAZ, C.S. Detection of paracoccidioidomycosis circulating antigens by the immunoeletrophoresis-immunodiffusion technique. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 29, p. 327-328, 1987.
- GERBERT, J.D., RILEY, R.E., JONES, R.D. Evaluation of a micro-titer latex agglutionation test for histoplasmosis. **Appl. Microbiol.** v. 24, p. 191-197, 1972.
- GOLDMAN, G.H., MARQUES, F.R., RIBEIRO, D.C.D., BERNARDES, L.A.S., QUIAPIN, A.C. VITORELLI, P.M., et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 1, p. 34-48, 2003.

- GOMES, G.M., CISALPINO, P.S., TABORDA, C.P., CAMARGO, Z.P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3478-3480, 2000.
- GÓMEZ, B.L., FIGUEROA, J.I., HAMILTON, A.J., ORTIZ, B., ROBLEDO, M.A., HAY, R.J., RESTREPO, A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3278-3283, 1997.
- GÓMEZ, B.L., FIGUEROA, J.I., HAMILTON, A.J., DIEZ, S., ROJAS, M., TOBÓN, A.M., HAY, R.J., RESREPO, A. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and alter antifungal therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3309-3316, 1998.
- GOMÉZ, B.L., NOSANCHUK, J.D., DÍEZ, S., YONGCHIM, S., AISEN, P., CANO, L.E., RESTREPO, A., CASADEVALL, A., HAMILTON, A.J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5760-5767, 2001.
- GRAY, L.D. and ROBERTS, G.D. Experience with the use of pronase to eliminate interference factors in the latex agglutination test for cryptococcal antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2450-2451, 1988.
- HAHN, R.C., MACEDO, A.M., FONTES, C.J.F., BATISTA, R.D., SANTOS, N.L., HAMDAN, J.S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2849-2854, 2003.
- HAMILTON, J.R., NOBLE, A., DENNING, D.W., STEVENS, D.A. Performance of *Cryptococcus* antigen latex agglutination kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of AIDS patients before and after pronase treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 333-339, 1991.
- HANNA, S.A., MONTEIRO DA SILVA, J.L., MENDES-GIANNINI, M.J.S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 877-887, 2000.
- HEBELER-BARBOSA, F., MORAIS, F.V., MONTENEGRO, M.R., KURAMAE, E.E., MONTES, B., McWEN, J.G., BAGAGLI, E., PUCCIA, R. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and *PbGP43* genes of

- Paracoccidioides brasiliensis from patients and armadillos (Dasypus novemcinctus). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5735-5737,2003.
- HILL, G.B., CAMPBELL, D.C. Commercially available histoplasmin sensitized latex particles in an agglutination test for histoplasmosis. **Mycopathologia**, v. 18, p. 169-176, 1962.
- HOPWOOD, V., EVANS, E.G.V., CARNEY, J.A. Rapid diagnosis of vaginal candidosis by latex particle agglutination. **J Clin Pathol**, v. 38, p. 455-458, 1985.
- HULL-JACKSON, C., GLASS, M.B., ARI, M.D., BRAGG, S.L., BRANCH, S.L., WHITTINGTON, C.U., EDWARDS, C.N., LEVETT, P.N. Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1853-1855, 2006.
- HUPPERT, M., et al,. Evaluation of a latex particle agglutination test for coccidioidomycosis. **Amer J. Clin. Path.**, v. 49, p. 96-102, 1968.
- JOHNSON, J.E., ROBERTS, G.D., GORDON, M.A., LAPA, E.W. Elimination of rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. Am. J. Clin. Pathol., v. 60, p. 488-494, 1974.
- JUVENALI, M., DEL NEGRO, G.M.B., DUARTE, A.J.S., BENARD, G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form of paracoccidioidomycosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 127-134, 2001.
- KALMAR, E.M.N., ALENCAR, F.E.C., ALVES, F.P., PANG, L.W., DEL NEGRO, G.M.B., CAMARGO, Z.P., SHIKANAY-YASUDA, M.A. Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the brazilian amazon using skin tests. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 1, p. 82-86, 2004.
- KAMI, M., TANAKA, Y., KANDA, Y., OGAWA, S., MASUMOTO, T., OHTOMO, K., MATSUMURA, T., SAITO, T., MACHIDA, U., KASHIMA, T., HIRAI, H., Computed tomographic scan of the chest, látex agglutination test and plasma $(1\rightarrow 3)$ -β-D-glucan assay in early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study of 215 patients. **Haematologica**, v. 85, p. 745-752, 2000.

- KAUFMAN, L. and BLUMER, S. Value and interpretation of serological tests for the diagnosis of cryptococcosis. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1907-1912, 1968.
- KAUFMAN, L., COWART, G., BLUMER, S., STINE, A., WOOD, R. Evaluation of commercial latex agglutination test kit for cryptococcal antigen. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 620-621, 1974.
- KAUFMAN, L., STANDARD, P.G., JALBERT, M., KANTIPONG, P., LIMPAKARJANARAT, K., MASTRO, T.D. Diagnostic antigenemia test for Penicilliosis *marneffei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2503-2505, 1996.
- KAUFFMANN-LACROIX, C., RODIER, M.H., JACQUEMIN, J.L. Detection of galactomannan for diagnosis of fungal rhinosinusitis. Letters to editor. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4593-4594, 2001.
- KISKA, D.L., ORKISZEWSKI, D.R., HOWELL, D., GILLIGAN, P.H. Evaluation of new monoclonal antibody-based latex agglutination test for detection of cryptococcal polysaccharide antigen in serum and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2309-2311, 1994.
- LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LONDERO, A.T., MELO, I.S. Paracoccidiodidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia**, v. 82, n. 1, p. 49-55, 1983.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. **Brasil Medico**, v. 22, p. 141-144, 1908.
- MACHETTI, M., FEASI, M., MRODINI, N., VAN LINT, M.T., BACIGALUPO, A., LATGE, J.P., SARFATI, J., VISCOLI, C. Comparison of an enzyme immunoassay and a látex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in boné marrow transplant recipients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 21, p. 917-921, 1998.
- MACORIS, S.A.G., SUGIZAKI, M.F., PERAÇOLI, M.T.S., BOSCO, S.M.G., HEBELER-BARBOSA, F., SIMÕES, L.B., THEODORO, R.C., BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis*

- isolates obtained from armadillos and patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 331-334, 2006.
- MAESAKI, S., KAWAMURA, S., HASHIGUCHI, K., HOSSAIN, M.A., SASAKI, E., MIYAZAKI, Y., TOMONO, K., TASHIRO, T., KOHNO, S. Evaluation of Sandwich ELISA galactomanan test an samples of positive aspergillus antibody. **Internal Medicine**, v. 38, n. 12, p. 948-950, 1999.
- MAMONI, R.L., ROSSI, C.L., CAMARGO, Z.P., BLOTTA, M.H.S.L. Capture enzymelinked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 65, n. 3, p. 237-241, 2001.
- MAMONI, R.L., NOUER, S.A., OLIVEIRA, S.J., MUSATTI, C.C., ROSSI, C.L., CAMARGO, Z.P., BLOTTA, M.H.S.L. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 153-159, 2002.
- MARQUES, S.A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical and treatment update. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 2, p. 135-150, 2003.
- MARQUES-DA-SILVA. S.H., 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.
- MARQUES-DA-SILVA. S.H., QUEIROZ-TELLES, F., COLOMBO, A.L., BLOTTA, M.H.S.L., LOPES, J.D., CAMARGO, Z.P. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2419–2424, 2004a.
- MARQUES-DA-SILVA. S.H., GROSSO, D.M., LOPES, J.D., COLOMBO, A.L., BLOTTA, M.H.S.L., QUEIROZ-TELLES, F., CAMARGO, Z.P. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4480–4486, 2004b.
- MARQUES-DA-SILVA. S.H., COLOMBO, A.L., BLOTTA, M.H.S.L., F., 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. 4680–4683, 2005.
- MARQUES-DA-SILVA, S.H., COLOMBO, A. L., BLOTTA, M.H.S.L., QUEIROZ-TELLES, F., BALTHAZAR, A.B., LOPES, J.D., CAMARGO, Z.P. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 1363–1366, 2006.
- MARTINS, T.B., JASKOWSKI, T.D., MOURITSEN, C.L., HILL, H.R. Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to *Coccidioides immitis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 940-943, 1995.
- MATTAR-FILHO, R., AZEVEDO, M.O., PEREIRA, M., JESUINO, R.S.A., SALEM-IZACC, S.M., BRITO, W.A., GESZTESI, J.L., SOARES, R.B.A., FELIPE, M.S.S., SOARES, C.M.A. Expression of glycoprotein gp43 in stage-especific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 35, p. 341-345, 1997.
- MATTHEUS, R. and BURNIE, J. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzymelinked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 459-463, 1988.
- MATTOS-GROSSO, D., ALMEIDA, S.R., MARIANO, M., LOPES, J.D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6534-6542, 2003.
- MATUTE, D.R., SEPULVEDA, V.E., QUESADA, L.M., GOLDMAN, G.H., TAYLOR, J.W., RESTREPO, A., McEWEN, J.G., Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2153-2157, 2006.
- McEWEN, J.G., ORTIZ, B.L., GARCIA, A.M., FLOREZ, A.M., BOTERO, S., RESTREPO, A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 20, p. 125-131, 1996.
- McGOWAN, K.L. and BUCKLEY, H.R. Preparation and use of cytoplasmatic antigens for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 39-43, 1985.

- MENDES-GIANNINI, M.J.S., CAMARGO, M.E., LACAZ, C.S., FERREIRA, A.W. Immunoenzymatic absortion test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 103-108, 1984.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S., SHIKANAI-YASUDA, A.P., FERREIRA, A.W., MASUDA, A. Detection of the 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: **Paracoccidioidomycosis**. M.F. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo, G. Del Negro, (eds.). CRC Press. Boca Raton, Fla 1994. p. 345-363.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S., TAYLOR, M.L., BOUCHARA, J.B., BRUGER, E., CALICH, V.L.G., ESCALENTE, E.D., HANNA, S.A., LENZI, H.L., MACHADO, M.P., MIYAJI, M., MONTEIRO DA SILVA, J.L., MOTA, E.M., RESTREPO, A., RESTREPO, S., TRONCHIN, G., VINCENZI, L.R., XIDIEH, C.F. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 113-123, 2000.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S., ANDREOTTI, P.F., VINCENZI, L.R., MONTEIRO DA SILVA, J.L., LENZI, H.L., BENARD, G., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R., GUEDES, H.L.M., SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1550-1559, 2006.
- MERZ, W.G., EVANS, G.L., SHADOMY, S., ANDERSON, S., KAUFMAN, L., KOZINN, P.J., MACKENZIE, D.W., PROTZMAN, W.P., REMINGTON, J.S. Laboratory evaluation of serological tests for systemic candidiasis: a comparative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.5, n. 6, p. 596-603, 1977.
- MISAKI, H., IWASAKI, H., UEDA, T., A comparison of the specificity and sensitivity of two *Candida* antigen assay system for the diagnosis of deep candidiasis in patients with hematologic diseases. **Med Sci Monit**, v. 9, n. 2, p. MT1-MT7, 2003.
- MISTRETA, T. M.J. SOUZA, L.G. CHAMMA, S.Z. PINHO . FRANCO. Serology of paracoccidioidomycosis. I . Evaluation of the indirect immunofluorescente test. **Mycopathol**, v. 89, n. 1, p. 13-17, 1985.
- MONTENEGRO, M.R.G. Formas clínicas da paracoccidioidomicose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 28, p. 203-204, 1986.

- MONTENEGRO, M.R.G. and FRANCO, M. Pathology. In: **Paracoccidioidomycosis**. Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G., (eds.). CRC Press. Boca Raton, Fla 1994. p. 131-150.
- MOTA, N.G., REZKALLAH-IWASSO, M.T., PERAÇOLI, M.T., AUDI, R.C., MENDES, R,P., MARCONDES, J., MARQUES, A.S., DILLON, N.L., FRANCO, M.F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 6, p. 765-772, 1985.
- MOSES, A. Fixação de complemento na blastomicose. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 8, p. 68-70, 1916.
- NAIFF, R.D., FERREIRA, L.C.L., BARRET, T.V., NAIF, M.F., ARIAS, J.R. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 19-27, 1986.
- NEGRONI, R., FLORES, C.I., ROBLES, A.M. Estudio de las reacciones serológicas cruzadas entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. **Rev. Assoc. Arg. Microbiol**., v. 8, n. 2, p. 67-73, 1975.
- NEVES, A.R., MAMONI, R.L., ROSSI, 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 agains carbohydrate epitopes. **Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 802-807, 2003.
- NEVES, S.L., PETRANI, T.F., FEDATTO, P.F., ONO, M.A. Paracoccidioidomycosis in wild and domestic animals. **Seminal: Ciências agrárias**, v. 27, n. 3, p. 481-488, 2006.
- NUNES, L.R., OLIVEIRA, R.C., LEITE, D.B., SCHMIDT DA SILVA, V., *et al.* Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 12, p. 2115-2128, 2005.
- ÖNCEL, T., VURAL, G., BABÜR, C., KILIÇ, S. Detection of *Toxoplasma gondii* seropositivity in sheep in yalova by sabin feldmen dye test and latex agglutination test. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v. 29, n. 1, p. 10-12, 2005.

- ORTIZ, B.L., GARCIA, A.M., RESTREPO, A., McEWEN, J.G. Immunological characterization of recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 2, p. 239-241, 1996.
- ORTIZ, B.L., DÍEZ, S., URÁN. M.E., RIVAS, J.M., ROMERO, M., CAICEDO, V., RESTREPO, A., McEWEN, J.G. Use of the 27-kilodalton recombinat protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 6, p. 826-830, 1998.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 26, p. 507-515, 1949.
- OXENHANDLER, R.W., ADELSTEIN, E.H., ROGERS, W.A. Rheumatiod factor: a cause of false positive histoplasmin latex agglutination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 31-33, 1977.
- PANIAGO, A.M.M., AGUIAR, J.I.A., SETTI AGUIAR, E., CUNHA, R.V., PEREIRA, G.R.O.L., LONDERO, A.T., WANHE, B. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira da Sociedade de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455-459, 2003.
- PANUNTO-CASTELO, A., FREITAS-DA-SILVA, G., BRAGHETO, I.C., MARTINEZ, ROQUE-BARRERA, M.C. Paracoccidioides brasiliensis exoantigens: R., reconiation bν IgG from patients with different clinical forms paracoccidioidomycosis. Microbes and Infection, v. 5, p. 1205-1211, 2003.
- PAPPAGIANIS, D. & ZIMMER, B.L. Serology of coccidioidomycosis. **Clin. Microbiol. Rews.**, v. 3, p. 247-268, 1990.
- PARENTE, J.A., COSTA, M., PEREIRA, M., SOARES, C.M.A., Transcriptome overview of *Paracoccidioides brasiliensis* proteases. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 358-371, 2005.
- PETROFEZA DA SILVA, S., BROGES-WALMSLEY, M.I., PEREIRA, I.S., SOARES, C.M.A., WALMSLEY, A.K., FELIPE, M.S.S. Differential expression of na *hsp70* gene during transition from the mycelial to the infective yeast formo of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1039-1050, 1999.

- PHILLIPS, P., DOWD, A., JEWESSON, P., RADIGAN, G., TWEEDDALE, M.G., CLARKE, A., GREERE, I., KELLY, M. Novalue of antigen detection immunoassays for diagnosis of candidemia. **Journal of Clinical microbiology**, v. 28, n. 10, p. 2320-2326, 1990.
- POLAIN, D., HOPWOOD, V., VERNES, A. Antigenic variability of *Candida albicans*. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 12, p. 223-270, 1985.
- PREVOST, E. and NEWELL, R. Commercial cryptococcal latex kit: clinical evaluation in a medical center hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 529-533, 1978.
- PUCCIA, R., SCHENKMAN, S., GORIN, P.A.J., TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.
- PUCCIA, R. and TRAVASSOS, L.R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis:* immunological reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 1610-1615, 1991a.
- PUCCIA, R. and TRAVASSOS, L.R. The 43 kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form excretion and susceptibility to proteolysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 289, p. 289-302, 1991b.
- REIS, B.S., BOZZI, A., PRADO, F.L.S., PEREIRA, M.C.N., FERREIRA, F.E., GODOY, P., MORO, L., PEDROSO, E.P., LEITE, M.F., GOES, A.M. Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 307, p. 118-126, 2005.
- RESTREPO-MORENO, A. and SCHNEIDAU JR, J.D. Nature of the skin-reactive principle in culture filtrates prepared from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 6, p. 1741-1748, 1967.
- RESTREPO, A., MONCADA, L.H. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion test for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 132-137, 1972.

- RESTREPO, A., MONCADA, L.H. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 138-144, 1974.
- RESTREPO A. and MONCADA, L.H. Una prueba de látex en lámina para el diagnostico de la paracoccidioidomicosis. **Bol. Sanit. Panam.**, v. 84, n. 6, p. 520-531, 1978.
- RESTREPO, A., SALAZAR, M.E., CANO, L.E., STOVER, E.P., FELDMAN, D., STEVENS, D.A. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis:* implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 23, p. 323-334, 1985.
- RESTREPO, A. A report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis. **ISHAM Mycoses Newsletter,** v. 59, p. 4, 1992.
- RESTREPO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: **Paracoccidioidomycosis**. M.F. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo, G. Del Negro, (eds.). CRC Press. Boca Raton, Fla 1994. p.121-128.
- RODRIGUES, M.C., CASSAGUERRA, C.M., LACAZ, C.S. Antigenemia in paracoccidioidomycosis demonstration of circulating antigen by counterimmunoeletrophoresis test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 26, p. 285-287, 1984.
- SAHA, D.C., XESS, I., JAIN, N. Evaluation of convencional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis. **Indian J Med Res**, v. 127, p. 483-488, 2008.
- SALAZAR, M.E., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 711-713, 1988.
- SALINA, M.A., SHIKANAI-YASUDA, M.A., MENDES, R.P., BARRAVIERA, B., MENDES-GIANNINI, M.J.S. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1723-1728, 1998.

- SAN-BLAS, G., NOÑO-VEGA, G., BARRETO, L., HEBELER-BARBOSA, F., BAGAGLI, E., BRICEÑO, R.O., MENDES, R.P. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4255-4257, 2005.
- SANDHU, G.S., ALEFF, R.A., KLINE, B.C., LACAZ, C.S. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1894-1896, 1997.
- SANTOS, W.A., MORAES DA SILVA, B., PASSOS, E.D., ZANDONADE, E., FALQUETO, A. Associação entre o tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 245-253, 2003.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A., TELLES FILHO, F.Q., MENDES, R.P., COLOMBO, A.L., MORETTI, M.L., GRUPO DE CONSULTORES DO CONSENSO EM PARACOCCIDIOIDOMICOSE. Guideliness in Paracoccidioidomycosis. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.
- SILVA-VERGARA, M.L. Contribuição ao estudo epidemiológico da paracoccidioidomicose: estudo em área rural de cultura de café. Resumo de Tese. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, p. 83-86, 1997.
- SILVA-VERGARA, M.L. and MARTÍNES, R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 15, p. 294-297, 1998.
- SILVA-VERGARA, M.L., MARTINEZ, R., CAMARGO, Z.P., MALTA, M.H., MAFFEI, C.M., CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, p. 193-199, 2000.
- SINGER-VERMES, L.M., CALDEIRA, C.B., BURGER, E., CALICH, V.L.G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin Exp Immunol**, v. 94, p 75-79, 1993.
- SIQUEIRA, A.M. Diagnóstico imunológico. In: **Paracoccidioidomicose, Blastomicose sul- americana**. G. Del Negro, C.S Lacaz, and A.M. Fiorillo (eds). Sarvier-EDUSP, São Paulo, Brazil. 1982. p-253-264.

- SNOW, R.M. and DISMUKES, W.E. Cryptococcal meningitis: diagnosis value of cryptococcal antigen in cerebrospinal fluid. **Arch. Intern. Med.**, v. 135, p. 1155-1157, 1975.
- SOARES, C.M.A., MOLLINARI MADLUN, E.E.W., SILVA, S.P., PEREIRA, M., FELIPE, M.S.S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 505-507, 1995.
- SOUZA, M.C., GESZTESI, J.L., SOUZA, A.R., MORAES, J.Z., LOPES, J.D., CAMARGO, Z.P. Difference in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 1032-1039, 1997.
- SPLENDORE, A. Un'affezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservada in Brasile, determinate da funghi appartenentialla tribù degli exoascei (*Zymonema brasiliense* n.s.p.) In: Volume in onore del prof. Angelo Celli nel 25 ° Anno di Insegnamento. 421-458,1912
- STAMBUK, B.U., PUCCIA, R., DE ALMEIDA, M.L.C., TRAVASSOS, L.R., SCHENKMAN, S. Secretion of the 43 kDa glyprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, p. 367-373, 1988.
- STICKLE, D., KAUFMAN, L., BLUMER, S.O., MCLAUGHLIN, D. Comparison of a newly developed latex agglutination test and immunodiffusion test in the diagnosis of systemic candidiasis. **Appl. Microbiol**, v. 23, p. 490-499, 1972.
- STOCKMAN, L. and ROBERTS, G.D. Specificity of the latex test for cryptococcal antigen: a rapid, simple method for eliminating interference factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, p. 945-947, 1983.
- STOVER, E.P., SCHÄR, G., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A., FELDMAN, D. Estradiol- binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Imunity**, v. 51, n. 1, p. 199-203, 1986.
- SUNDAR, S., AGRAWAL, S., PAI, K., CHANCE, M., HOMMEL, M. Detection of leishmanial antigens in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 2, p. 269-271, 2005.

- SVIDZINSKI, T.I.E., MIRANDA NETO, M.H., SANTANA, R.S., FISCHMAN, O., COLOMBO, A.L. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 41, n. 5, p. 279-283, 1999.
- TABORDA, C.P. and CAMARGO, Z.P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, p. 155-160, 1993.
- TABORDA, C.P. and CAMARGO, Z.P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 554-556, 1994.
- TAKAHACHI, G., MALUF, M.L.F., SVIDZINSKI, T.I.E., DALALIO, M.M.O., BERSANI-AMADO, C.A., CUNAN, R.K.N. *In vivo* and *in vitro* effects of the Canova medicine on experimental infection with *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Indian J Pharmacol**, v. 38, n. 5, p. 350-354, 2006.
- TANAKA, K.S., KOHNO, T., MIYAZAKI, H., MIYAZAKI, K., MITSUTAKE, S., MAESAKI, M., KAKU, KOGA, H.. The eiken látex test for detection of a cryptococcal antigen in cryptococcosis. Comparison with a monoclonal antibody-basead latex agglutination test, Pastorex *cryptococcus*. **Mycopathol**, v. 127, p. 131-134. 1994.
- TANEJA, N., RAO, P., RAMAN RAO, D.S.V., SINGH, M., SHARMA, M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* causing cholerogenic syndrome during an interepidemic period of cholera in north India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 59, p. 245-248, 2006.
- TANNER, D.C., WEINSTEIN, M.P., FEDORCIW, B., JOHO, K.L., THORPE, J.J., RELLER, L.B. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1680-1684, 1994.
- TAVARES, A.H., SILVA, S.S., BERNARDES, V.V., MARANHÃO, A.Q., RYAN, C.M., POÇAS-FONSECA, M., SILVA-PEREIRA, I. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 372-389, 2005.
- TEMSTET, A., ROUX, P., POIROT, J., RONIN, O., DROMER, F. Evaluation of a monoclonal antibody-based latex agglutination test for diagnosis of

- cryptococcosis: comparison with two tests using polyclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 10, p. 2544-2550, 1992.
- TERÇARIOLI, G.R., BAGAGLI, E., REIS, G.M., THEODORO, R.C., BOSCO, S.M.G., MACORIS, S.A.G., RICHINI-PEREIRA, V.B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BCM Microbiology**, v. 7, p. 92, 2007.
- VAZ, C.A.C., MACKENZIE, D.W.R., HEARN, V.M., CAMARGO, Z.P., SINGER-VERMES, L.M., BURGER, E., CALICH, V.L.G. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 88, p. 119-123, 1992.
- VAZ, C.A.C., SINGER-VERMES, L.M., CALICH, V.L. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 59, n. 6, p. 971-977, 1998.
- VERWEIJ, P.E., RIJS, A.J.M.M., PAUW, B.E.De, HORREVORTS, A.M., HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A., MEIS, J.F.G.M. Clinical evaluation and reproducibility of the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis. **J. Clin. Pathol.**, v. 48, p. 474-476, 1995.
- VICENTINI, A.D., GESZTESI, J., FRANCO, M.F., SOUZA, W., MORAES, J.Z., TRAVASSOS, L.R., LOPES, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465-1469, 1994.
- VIDAL, M.S.M., BENARD, G., BRITO, T., DANTAS, D.K., PEREIRA, C.N., FRANÇA, F.O.S., SILVA, A.M.G., MARTINS, J.E.C. Atypical serological response marked by lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 43, n. 6, p. 3014-3016, 2005.
- WALLENBECK, I., AUKRUST, L., EINARSSON, R. Antigenic variability of different strains of *Aspergillus fumigatus*. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 73, p. 166-172, 1984.
- WANKE, B., and LONDERO, A.T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: **Paracoccidioidomycosis**. M.F. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo, G. Del Negro, (eds.). CRC Press. Boca Raton, Fla 1994. p. 109-120.

- WATARAI, M., KIM, S., YAMAMOTO, J., MIYHARA, K., KAZAMA, M., MATSUOKA, S., CHIMURA, S., SUZUKI, H. A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 69, n. 5, p. 477-480, 2007.
- WEINER, M.H. and COATS-STEPHENS, M. Immunodiagnosis of systemic aspergollosis. I. Antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental infection. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 93, p. 111-119, 1979.
- WEIST, K., CIMBAL, A., LECKE, C., KAMPF, G., RÜDEN, H., VANBERG, R. Evaluation of six tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of meticilin-resistant *S. aureus* (MRSA). **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 283-290, 2006.
- WHEAT, L.J., KOHLER, R.B., TEWARI, R.P. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, p. 83-88, 1986.
- WHEAT, L.J. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. **Transplant Infections Disease**, v. 8, p. 128-139, 2006.
- WHITTIER, S., HOPFER, R.L., GILLIGAN, P. Elimation of false-positive serum reactivity in the latex agglutination test for cryptococcal antigen in human immunodeficiency virus-infected population. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2158-2161, 1994.
- YARZABAL, L.A. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana, revelados por inmunoelectroforesis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 13, p. 320-327, 1971.
- YARZABAL, L.A., BOUT, D., NAQUIRA, F., FRUIT, J., ANDRIEU, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**, v. 15, p. 79-85, 1977.
- YARZABAL, L.A. Composición antigénica de *Paracoccidioides brasiliensis*. *In*: Del Negro, g., Lacaz, C.S., Fiorillo, A.M. (ed.), **Paracoccidioidomycoses** (Blastomycose Sul-Americana). Sarvier EDUSP, Sãp Paulo, Brasil, 1982. p.61-61.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M., BRAGG, S.L., REISS, E., WANKE, B., PERALTA, S.M. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on coss-reactivity in the Enzime-Linked Immunoeletransfer Blot Method. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 1, n. 4, p. 390-393, 1994.

ANEXOS E APÊNDICE

ANEXO I



Carta de nº 0022/2007 Protocolo CEP/IEC - Nº 0011/07 CAAE: 0013.0.072,000-07

Ananindous/PA, 29 de agosto de 2007.

COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: "Uso de particulas de latex no diagnostico da paracoccidioidomicose".

Pesquisador Responsável: SILVIA HILLINA MARQUIS DA SILVA

 Conforme tramitação junto ao CEP/IEC, o projeto em questão foi considerado aprovado.

Recomenda-se ao ocordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preeochidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

MANDIEL DO CRESSO PERSILEA SOMES Coordenador do CEPTEC

ANEXO II



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológic

Dados do Processo

Edital MCT/CNPq 15/2007 - Universal - Edital MCT/CNPq 15/2007 - Universal - Faixa B - De R\$ 20.001,00 a R\$ 50.000,00 Edital:

Beneficiário: Silvia Helena Marques da Silva

Processo: 471106/2007-0

Título: 2050 de partículas de látex no diagnóstico da Paracoccidioidomicose ?

Instituição: Instituto Evandro Chagas / IEC - PA

Vigencia: 21/11/2007 a 20/11/2009

APÊNDICE

(Desenho Experimental)

