

PRODUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE  
*PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* (Pb),  
*HISTOPLASMA CAPSULATUM* (Hc) E  
*ASPERGILLUS FUMIGATUS* (Af) PARA USO NO IMUNODIAGNÓSTICO.  
COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNODIFUSÃO  
E IMUNOELETROOSMOFORESE

MARIA DE FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ\*, BERNARDO GALVÃO-CASTRO\*  
& BODO WANKE\*\*

*Foram produzidos antígenos solúveis de P. brasiliensis, H. capsulatum e A. fumigatus e padronizados nas técnicas de imunodifusão dupla (IDD) e imunoeletroosmoforese (IEOF).*

*A especificidade dos antígenos foi testada utilizando-se 96 soros de pacientes com paracoccidiodomicose, histoplasmose, aspergilose, candidiase sistêmica, esporotricose, tuberculose, neoplasia pulmonar, leishmaniose tegumentar e visceral e em 18 indivíduos sadios. Na IDD, a especificidade foi de 100% usando-se como critério de positividade linhas de precipitação com identidade total com soro de referência. Entretanto na IEOF, a especificidade variou de acordo com o antígeno testado, sendo observadas reações cruzadas com antígeno de P. brasiliensis frente a soros de pacientes com histoplasmose (16,7%) e leishmaniose tegumentar (10%) e com antígeno de H. capsulatum frente a soros de pacientes com paracoccidiodomicose (31,8%) e leishmaniose tegumentar (10%).*

*Ambas as técnicas mostraram a mesma sensibilidade para o sorodiagnóstico de paracoccidiodomicose, histoplasmose e aspergilose, respectivamente 100%, 83,3% e 100%.*

*A grande sensibilidade e especificidade da IDD observadas nos soros desses pacientes, aliadas à fácil reprodutibilidade e baixo custo, fazem esta técnica muito apropriada como procedimento de rotina, para a triagem de pacientes sintomáticos respiratórios.*

As micoses sistêmicas e oportunistas são doenças invasivas que podem ter curso fatal se não diagnosticadas e tratadas corretamente. As primeiras se caracterizam por serem infecções adquiridas por inalação, com lesão primária e manifestações predominantes pulmonares, causadas por fungos dimórficos. As segundas têm por agente causal fungos primariamente saprófitas, cuja incidência vem aumentando paralelamente ao uso de antibióticos, imunossupressores, prolongada medicação via parenteral e doenças debilitantes.

A prevalência dessas micoses no Brasil ainda não é conhecida. A dificuldade de diagnóstico pode ser atribuída à falta de caracteres clínico-radiológicos diferenciais entre as micoses e outras patologias. Se bem que uma combinação de evidências micológicas e histopatológicas forneçam as únicas bases para um diagnóstico inequívoco, nem sempre elas podem ser obtidas, devido à inacessibilidade à lesão para a coleta de material biológico. Mesmo após a obtenção de material biológico, o diagnóstico pode não ser prontamente fornecido, uma vez que o isolamento do fungo requer aproximadamente três a seis semanas. Nesses casos, os testes sorológicos são imprescindíveis para o diagnóstico.

Entre as técnicas sorológicas utilizadas no imunodiagnóstico destaca-se a imunodifusão dupla pela especificidade e simplicidade de execução (Heiner, 1958; Lazo, 1962; Restrepo, 1966; Coleman & Kaufman, 1972; Londero et al., 1981).

Com o objetivo de viabilizar um programa sobre a prevalência de micoses sistêmicas e oportunistas, foram produzidos e padronizados antígenos solúveis de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus*.

---

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (Projeto nº 780618) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Parte de tese de Mestrado (M.F.F.C.).

Instituto Oswaldo Cruz, \*Departamento de Imunologia (Centro colaborador da OMS para pesquisa e treinamento em imunologia de doenças parasitárias) e \*\*Departamento de Micologia, Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido para publicação em 2 de janeiro e aceito em 26 de fevereiro de 1985.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Para a análise da sensibilidade e especificidade dos antígenos de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus*, em relação a antígenos comuns às micoses pesquisadas, bem como a outras micoses, foram testados soros de pacientes com paracoccidioidomicose (22), histoplasmose (06), aspergilose (06) e esporotricose (01) micologicamente comprovados. Considerando-se, também, a possibilidade de reações cruzadas com outras doenças cujas manifestações clínicas podem ser confundidas com as micoses estudadas, foram selecionados soros de indivíduos com tuberculose (20), neoplasia pulmonar (08), leishmaniose visceral (21) e leishmaniose tegumentar (10), comprovados respectivamente por baciloscopia de escarro, histopatologia de pulmão, exame direto e/ou cultura de aspirado de medula óssea e demonstração do parasita em cortes histológicos.

**Antígenos de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus*:** para a obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* foram utilizadas as amostras SM, 192 e 265 provenientes da micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e amostra HU-2 isolada e mantida em nosso laboratório em meio Sabouraud a 35°C com repiques a cada 15 dias. As amostras foram cultivadas individualmente, para se assegurar do crescimento de cada uma delas, em meio de cultura (Fava Netto et al., 1969), por um período de 13-15 dias. Decorrido o prazo de crescimento, o cultivo foi ressuspense em salina tamponada pH 7,2 (PBS) e retirado do meio. Esta suspensão foi centrifugada seis vezes em PBS, a 1.200 g, durante dez minutos, a 4°C. O precipitado assim lavado, foi ressuspense volume a volume (g/ml) e exposto ao ultra-som (Branson Sonifier Gel Disruptor B-15, Alemanha) para rompimento das células. Foram feitas 12 exposições de três minutos de duração, com intervalos de dois minutos, a uma potência de 95 W e uma frequência fixa de 20.000 ciclos por segundo. Após exposição, a amostra foi centrifugada três vezes a 1.200 g, durante dez minutos a 4°C desprezando-se o precipitado. O sobrenadante foi então centrifugado a 40.000 g durante 30 minutos, a 4°C.

Para a obtenção dos antígenos de *H. capsulatum* foram utilizadas as amostras RS-1, RS-9 e RS-36, mantidas em nosso laboratório, em meio Sabouraud a temperatura ambiente (22°C). As cepas foram cultivadas individualmente em meio de Fava Netto et al. (1969), a temperatura ambiente durante 15 a 20 dias. As etapas de lavagem, centrifugação e esterilização foram semelhantes às da obtenção do antígeno de *P. brasiliensis*. O tempo de exposição do ultra-som foi de 18 exposições de três minutos, com as mesmas condições adotadas para a ruptura das células de *P. brasiliensis*.

Os antígenos de *A. fumigatus* constituíram-se de um "pool" de sobrenadantes de culturas de quatro amostras isoladas de pacientes com bola fúngica pulmonar intracavitária. Após o cultivo individual de cada isolado em meio líquido Sabouraud-cloranfenicol (500 mg/l) por um período de quatro semanas à temperatura ambiente, adicionou-se Thimerosal na concentração de 1:10.000. Após uma semana foi feito repique das culturas em meio Sabouraud, para controle de esterilidade. Os sobrenadantes foram concentrados por liofilização (Modulyo, Edwards, Ltd., Inglaterra). Após liofilização, o material foi ressuspense em água deionizada para obter-se um volume correspondente a 1:20 do volume original.

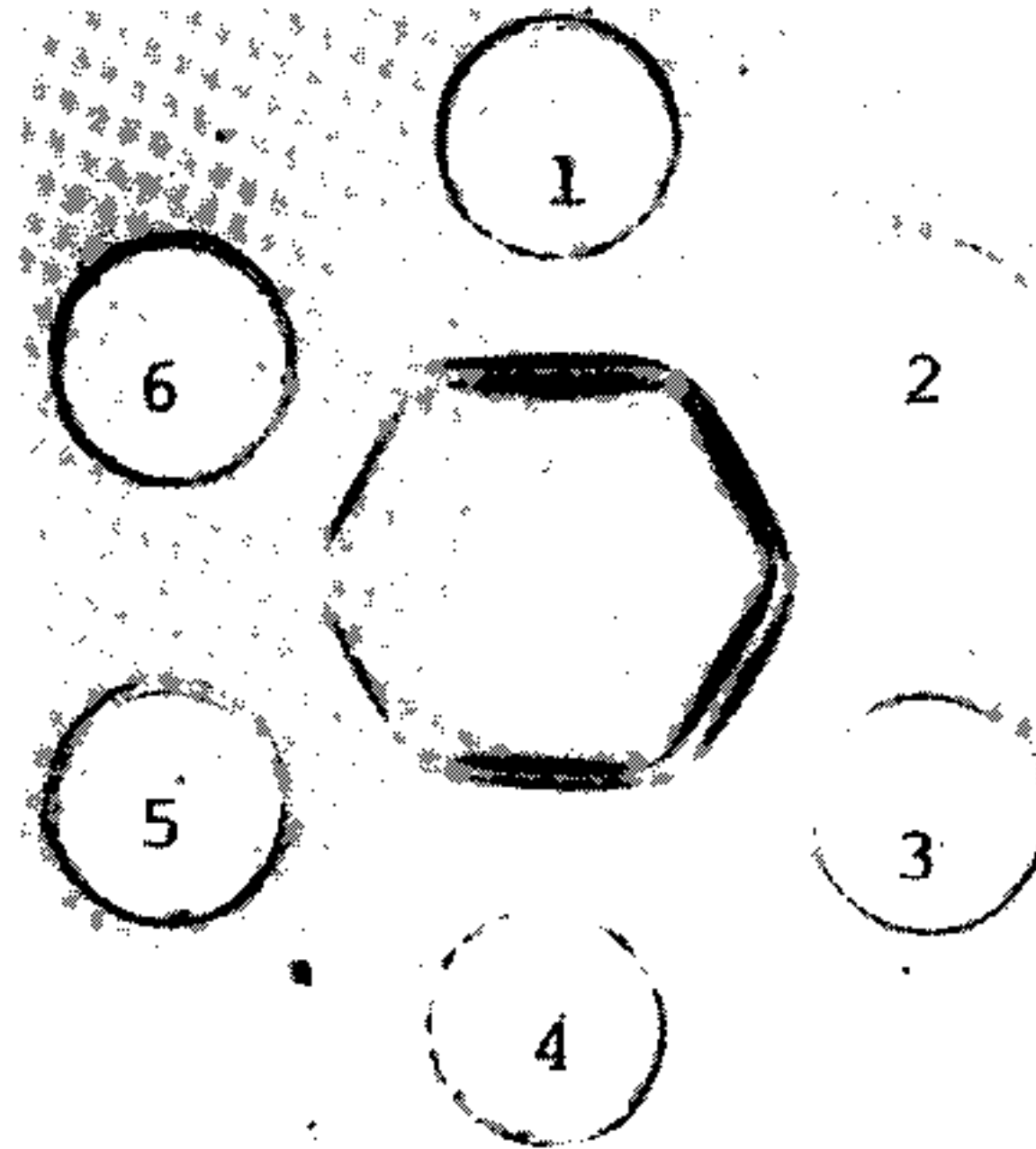


Fig. 1: imunodifusão dupla; orifício central: Ag de *P. brasiliensis*; orifícios 1 e 4: soros de referência; orifícios 2, 3, 5 e 6: soros de pacientes com paracoccidioidomicose com duas linhas (2, 3 e 5) e uma linha (6) de precipitação específica.



Todos os antígenos assim obtidos foram filtrados em membrana Millipore (0,45 a 0,22  $\mu$ m) e foi dosado o teor proteico pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando a albumina bovina como padrão.

**Imunodifusão dupla (IDD)** – Ouchterlony, 1962: foi realizada em lâminas de microscopia recobertas com gel de agarose a 1,2% em PBS. Cada soro foi testado sem inativação prévia, frente aos antígenos de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus*. As lâminas foram coradas pelo Coomassie Brilliant Blue R-250 e só foi considerado como positivo aquele soro que apresentasse linha(s) de precipitação com identidade total com um soro de referência (OPAS, 1972/ Fig. 1). Como soro padrão de histoplasmose utilizou-se um antissoro (Immuno Mycologics, Inc. USA), com linhas de precipitação específicas H e M (Heiner, 1958).

A concentração de proteínas do antígeno utilizada em cada reação, foi aquela onde se observou o melhor posicionamento e individualização das linhas de precipitação. Assim sendo, para cada soro padrão utilizado foram feitas diluições seriadas dos antígenos homólogos.

**Imunoeletrosmoforese (IEOF)**: foi realizada em lâminas de microscopia recobertas com 3,5 ml de agarose a 1,2% em tampão tris-barbital pH 8,6 e força iônica 0,05. Aplicou-se 20  $\mu$ l de soro nos orifícios de posição anódica e o mesmo volume de antígeno nos de posição catódica. A concentração de proteínas dos antígenos de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* foi 8 mg/ml e de *A. fumigatus* 12 mg/ml. O tempo de migração foi de 90 minutos com intensidade de corrente igual a 5 mA por lâmina, à temperatura ambiente (Gelman Sciences, Ann Arbor, EUA).

## RESULTADOS

Independente dos antígenos testados, não houve diferença de sensibilidade entre as duas técnicas, porém a especificidade variou de acordo com o antígeno testado (Tabela I).

TABELA I

Resultado da padronização dos antígenos (Ag) de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), *Histoplasma capsulatum* (Hc) e *Aspergillus fumigatus* (Af) nas técnicas de imunodifusão dupla (IDD) e imunoeletrosmoforese (IEOF)

Soros Testados	IDD			IEOF		
	Ag Pb	Ag Hc	Ag Af	Ag Pb	Ag Hc	Ag Af
	Nº Testados/Nº Positivos			Nº Testados/Nº Positivos		
Paracoccidioidomicose	22/22	22/0	22/0	22/22	22/7	22/0
Histoplasmose	6/0	6/5	6/0	6/1	6/5	6/0
Aspergilose*	6/0	6/0	6/6	6/0	6/0	6/6
Leishmaniose tegumentar	10/0	10/0	10/0	10/1	10/1	10/0

\* Bola fúngica pulmonar intracavitária por *A. fumigatus*

Soros negativos: Candidíase sistêmica (2), Esporotricose (1), Tuberculose (20), Neoplasia pulmonar (8), Leishmaniose visceral (21) e indivíduos sadios (18).

**Antígenos de *P. brasiliensis***: os 22 soros de pacientes com paracoccidioidomicose foram positivos tanto na IDD como na IEOF, revelando assim, uma sensibilidade de 100% para ambas as técnicas. O número de linhas variou de um a três pela IDD e de três a cinco pela IEOF. Os demais 92 soros de pacientes com diferentes nosologias e indivíduos sadios, foram negativos pela IDD, conferindo assim, uma especificidade de 100% para esta técnica. Somente dois destes soros, um dos seis (16,7%) pacientes com histoplasmose e um dos dez (10%) com leishmaniose tegumentar, apresentaram linhas de precipitação quando testados pela IEOF.

**Antígenos de *H. capsulatum***: cinco dos seis soros (83,3%) de pacientes com histoplasmose, não submetidos à reação intradérmica à histoplasmina, demonstraram precipitinas séricas pelas técnicas de IDD e IEOF. As linhas de precipitação foram identificadas pela IDD como M e H, sendo que dois dos soros apresentaram somente a linha M. Sete soros de pacientes com paracoccidioidomicose (31,8%) e um soro de paciente com leishmaniose tegumentar (10%) apresentaram linhas de precipitação pela IEOF. Entretanto, estes soros na IDD, embora apresentassem linhas de precipitação, foram considerados negativos, pois não mostraram identidade com o soro de referência. Os demais soros testados foram negativos tanto na IDD como na IEOF.

**Antígenos de *A. fumigatus***: todos os seis soros de indivíduos com aspergilose (bola fúngica pulmonar intracavitária por *A. fumigatus*) foram positivos pelas duas técnicas. O número de

linhas de precipitação variou de duas a quatro na IDD e de três a seis na IEOF. Não houve reação de precipitação quando testou-se soros provenientes de indivíduos sadios ou com outras nosologias.

## DISCUSSÃO

Na utilização da sorologia como rotina para auxílio diagnóstico é conveniente que as técnicas utilizadas sejam de fácil operacionalização e interpretação, não envolvendo equipamentos ou reagentes de alto custo.

No presente trabalho, ambas as técnicas utilizadas mostraram a mesma sensibilidade, respectivamente 100%, 83,3% e 100%, quando foram testados soros de pacientes com paracoccidioomicose, histoplasmose e aspergilose. Os nossos resultados em relação à paracoccidioomicose são semelhantes aos de Restrepo (1966), Restrepo & Moncada (1972), Londero et al. (1981) e Silveira Chagas (1982) que usaram como antígeno filtrado de cultura de *P. brasiliensis* na sua fase leveduriforme. Porém, Fava Netto et al. (1976), utilizando como antígeno filtrado obtido de duas amostras de *P. brasiliensis* em sua fase filamentosa, encontraram positividade de cerca de 50% e, Mistreta et al. (1983), utilizando antígeno de *P. brasiliensis* produzido a partir de células leveduriformes rompidas no ultra-som, 66% de positividade na IDD. Essa contradição poderia ser explicada pela diferença de fases (Fava Netto et al., 1976) e de amostras de *P. brasiliensis* utilizadas para a produção dos antígenos. De fato, San-Blas & San-Blas (1982) verificaram variações na composição química da parede celular entre isolados de *P. brasiliensis*. É provável que tais variações se traduzam por diferenças na composição antigênica de cada amostra. Na tentativa de diminuir esta variabilidade, os antígenos foram produzidos por um "pool" de amostras de *P. brasiliensis*.

Não encontramos diferença de sensibilidade entre a IDD e a IEOF, o que está de acordo com os trabalhos de Kleger & Kaufman (1973), Galussio, Fridman & Negroni (1973) e Silveira Chagas (1982). Entretanto, Gordon et al. (1971) relataram maior sensibilidade da IEOF para o sorodiagnóstico da paracoccidioomicose, histoplasmose e aspergilose. Acreditamos que esta divergência dos resultados possa ser explicada devido a diferentes antígenos e diferentes condições adotadas, tais como força iônica, molaridade e composição do tampão.

Em relação à especificidade, a IDD mostrou-se 100% específica não só frente a soros de pacientes com micoses mas também com soros de indivíduos com doenças parasitárias (leishmaniose visceral e tegumentar), bacterianas (tuberculose) e neoplásicas. Na IEOF verificamos reações cruzadas entre histoplasmose e paracoccidioomicose, além de reação falso-positiva observada com soro de paciente com leishmaniose tegumentar frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*. A diferença de especificidade entre a IDD e a IEOF pode ser explicada pela não identificação de linhas específicas de precipitação na IEOF. De fato, Kleger & Kaufman (1973) desenvolveram modificações na técnica de IEOF, para o uso no sorodiagnóstico da histoplasmose, de maneira a permitir a identificação das linhas de precipitação específicas, conseguindo, assim, a mesma especificidade da IDD. Embora Restrepo & Moncada (1974) tivessem observado reação de identidade entre a linha M e a precipitina 1, um dos sistemas antígeno-anticorpo específicos da paracoccidioomicose, nos nossos resultados ainda que linhas de precipitação fossem observadas na reação de soros de pacientes com paracoccidioomicose e antígeno de *H. capsulatum* e vice-versa, nenhuma delas apresentou identidade com o soro de referência.

A padronização das condições de operacionalização da IDD, mostrou a sua grande sensibilidade diante de soros de pacientes com paracoccidioomicose, histoplasmose e aspergilose comprovadas, assim como a sua grande especificidade quando soros de indivíduos sadios ou portadores de outras patologias foram analisados. Esses dados aliados à fácil reprodutibilidade e ao baixo custo fazem esta técnica muito apropriada como procedimento de rotina, para triagem de pacientes sintomáticos respiratórios.

## SUMMARY

Soluble antigens (Ag) from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* and *Aspergillus fumigatus* were prepared and standardized by double immunodiffusion (DID) and immunoelectroosmophoresis (IEOP). No difference in sensitivity was observed between the two techniques; 100% of standard patient sera were positive with *P. brasiliensis* and *A. fumigatus* Ag and 83,3% were positive with *H. capsulatum* Ag.

The specificity of the tests was verified testing 96 sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, systemic candidiasis, sporotrichosis, tuberculosis, lung cancer, visceral or cutaneous leishmaniasis and 18 sera from healthy individuals. All the three antigens were 100% specific with the DID (using the identification pattern indicated by the confluence of test serum with standard serum precipitin lines as a positive criterium). However in the IEOP, the specificity



varied with each Ag. Positive reactions with *P. brasiliensis* Ag were observed in 16,7% of histoplasmosis sera and in 10% of cutaneous leishmaniasis sera. On the other hand 31,8% of paracoccidioidomycosis and 10% of cutaneous leishmaniasis sera reacted with *H. capsulatum* Ag.

The high sensitivity and specificity of the DID test, its easy reproducibility and low cost, led us to consider it highly appropriate as a routine procedure for the screening of patients with respiratory infections.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLEMAN, R.M. & KAUFMAN, L., 1972. Use of the Immunodiffusion Test in the serodiagnosis of Aspergillosis. *Appl. Microbiol.*, 23 :301-308.
- FAVA NETTO, C.; GURGEL, M.A.; COSTA, E.O. & YASUDA, P.H., 1976. Contribuição à sorologia da paracoccidioidomicose. Comparação entre reações de fixação do complemento pelas técnicas de Wadsworth, Maltaner Y Maltaner e micrométodo e reações de precipitação em meio líquido e gel de agar. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18 :81-86.
- FAVA NETTO, C.; VEGAS, V.S.; SCIANNAMEA, J.J. & GUARNIERI, D.B., 1969. Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultura do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11 :177-181.
- GALUSSIO, J.C.; FRIDMAN, J.L. & NEGRONI, R., 1973. Rapid diagnosis of pulmonary mycosis by counter-electroosmophoresis. *Mycoph. Micol. Appl.*, 51 :143-146.
- GORDON, M.A.; ALMY, R.E.; GREENE, C.H. & FENTON, J.W., 1971. Diagnostic mycoserology by immunoelectroosmophoresis: A general, rapid and sensitive microtechnic. *Am. J. Clin. Pathol.*, 56 :471-474.
- HEINER, D.C., 1958. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics*, 22 :616-627.
- KLEGER, B. & KAUFMAN, L., 1973. Detection and identification of diagnostic *Histoplasma capsulatum* precipitates by counter electrophoresis. *Appl. Microbiol.*, 26 :231-238.
- LAZO, S.R.F., 1962. Diagnóstico presuntivo de la micosis profundas mediante el test de precipitación en agargel. *Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.*, 19 :47-63.
- LONDERO, A.T.; LOPES, J.O.S.; RAMOS, C.D. & SEVERO, L.C., 1981. A prova da dupla difusão em gel de agar no diagnóstico da paracoccidioidomicose. *Rev. AMRIGS*, 25 :272-275.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 :265-275.
- MISTRETA, T.; SOUZA, J.M.; CHAMMA, G.L. & FRANCO, M., 1983. Contribuição à sorologia da paracoccidioidomicose. *XIX Congr. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, pg. 126.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1972. Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnostico de las micosis sistêmicas. Parte I: Pruebas de inmunodifusión en agar. Washington, D.C., R.C. 11/9. 16 pp.
- OUCHTERLONY, O., 1962. Diffusion-in-gel-methods for immunological analysis. II. *Prog. Allergy*, 6 :30-154.
- RESTREPO, A., 1966. La prueba de inmunodifusión en el diagnostico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia*, 4 :223-230.
- RESTREPO, A. & MONCADA, L.H., 1972. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion test for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl. Microbiol.*, 24 :132-137.
- RESTREPO, A. & MONCADA, L.H., 1974. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Appl. Microbiol.*, 28 :133-144.
- SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F., 1982. Variability of cell wall composition in *Paracoccidioides brasiliensis*: A study of two strains. *Sabouraudia*, 20 :31-40.
- SILVEIRA CHAGAS, P.R., 1982. Pesquisa de agentes e anticorpos fúngicos em pacientes com pneumopatias a esclarecer. Tese. Escola Paulista de Medicina, São Paulo.