

REGIANE A. SZARGIKI

**PRODUÇÃO DO EXOANTÍGENO BRUTO
DO *Paracoccidioides brasiliensis* PARA
USO EM TESTES DIAGNÓSTICOS DE
IMUNODIFUSÃO DUPLA**

Monografia apresentada ao Departamento de de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob orientação de Nei Ferreira de Camargo Neto, docente da disciplina de imunologia e, Júlia Camillo, especialista em microbiologia do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos / ISEP.

Curitiba
1997

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - Setor de Produção de Antígenos e Anti-Soros, (no Instituto de Saúde do Paraná) sob co-orientação de Júlia Camillo (Farmacêutica Bioquímica) e no Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Patologia Básica (Universidade Federal do Paraná) sob orientação do Professor Nei Ferreira de Camargo Neto

AGRADECIMENTOS

A Terezinha Inês Stivalet Svidzinski do LEPAC (UEM) pelo apoio, amizade, grande disposição em prestar informações valiosas para o desenvolvimento deste trabalho, bem como o fornecimento da cepa B339 do *P. brasiliensis*, soros para o teste de ID, bibliografia, meios e reagentes para o cultivo e produção do antígeno.

Ao Dr. Flávio Queirós Telles do Setor de Micologia do Setor de Ciências da Saúde (Hospital de Clínicas de Curitiba) por fornecer os soros para o teste de ID, e o Setor de Sorologia por fornecer o antígeno para teste paralelo.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	5
II. OBJETIVOS.....	8
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
1. CONDIÇÕES PARA O PREPARO DO EXOANTÍGENO BRUTO DE <i>P. brasiliensis</i>	
1.1. Manutenção da cepa.....	9
1.2. Adaptação da cepa e preparo do exoantígeno.....	9
1.2.1. meio de Negroni.....	10
1.2.2. meio de Tomate.....	10
1.2.3. meio YPD.....	11
2. PREPARAÇÃO DOS LOTES DE ANTÍGENOS.....	12
2.1. Preparo dos pré-inóculos e inóculos.....	12
2.2. Concentração, diálise e liofilização.....	13
3. TESTE DE IMONUDIFUSÃO DUPLA.....	14
3.1 Preparo das lâminas e confecção da matriz.....	14
3.2 Titulação.....	14
IV. RESULTADOS.....	16
V. DISCUSSÃO.....	19
VI. CONCLUSÃO.....	22
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

I - INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é uma doença de natureza granulomatosa, crônica, cujo agente etiológico é o *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo dimórfico termo-dependente.

É autócone da América Latina mas de ocorrência principalmente no Brasil (regiões Sudeste e Sul), Colômbia, Venezuela e Guatemala. (RESTREPO, 1985)

A doença é endêmica de regiões que apresentam condições climáticas bem peculiares, floresta tropical e subtropical, alta umidade relativa do ar e temperaturas moderadas (17° - 24° C). Nestas condições o fungo desenvolve a forma miceliar apresentando colônias de aspecto cotonoso, cor esbranquiçada a creme, micélio hialino e hifas finas, septadas, artroconídios produtores de artrósporos que são provavelmente a forma infectante.

A 37° C cresce a forma de levedura de parede dupla e múltiplos brotamentos. Forma parasitária que pode ser também cultivada em meios sintéticos em laboratório. (MINGUETTI, 1983)

A paracoccidioidomicose afeta principalmente trabalhadores rurais em idade adulta do sexo masculino. Raramente é observada em crianças e adolescentes. (SOMENSI, 1997)

Acredita-se que a penetração do *P.brasiliensis* no organismo humano seja por inalação dos esporos, provocando inicialmente complexo pulmonar e

disseminando-se posteriormente por vias hematogênicas e/ou linfáticas. Há casos de ocorrência da doença por implantação traumática. Dos indivíduos que entram em contato com o fungo, a maioria permanece assintomático e apenas alguns evoluem para a doença ativa. Dependendo do estado imunológico do organismo as lesões curam-se ou tornam-se latentes, ou progridem em doença severa. Uma lesão pode ser reativada após vários anos comprometendo pele, mucosas, gânglios linfáticos, supra-renais, baço, fígado, intestino, ossos e sistema nervoso. (LOPES - MARTINEZ, 1988)

O diagnóstico da doença baseia-se em evidências clínico-radiológicas e na demonstração do agente etiológico nas lesões (raspado da lesão, biópsia, pus, escarro), bem como seu cultivo em meios sintéticos e inoculação em animais de laboratório. (LACAZ, 1991)

Embora os exames micológicos e histopatológicos combinados sejam conclusivos para o diagnóstico da doença, nem sempre podem ser efetuados dada a inacessibilidade às lesões para coleta do material quando se trata de pacientes com manifestações somente em órgãos internos. Desta forma, os métodos indiretos são de grande valia para diagnósticos em pacientes com sinais ou sintomas sugestivos da paracoccidioidomicose (PCM). Os testes sorológicos constituem procedimento de interesse na rotina de diagnóstico presuntivo da PCM, assim como para pesquisa do fungo. (UNTERKIRCHER, 1988)

Preparações antigênicas podem ser obtidas a partir de filtrados de cultivo de uma das fases do fungo (exoantígenos) e ainda por rompimento mecânico das células

ou solubilização de polissacarídeos da parede por métodos químicos ou físicos (antígenos citoplasmáticos), e são usadas em testes sorológicos. O teste de imunodifusão dupla emprega preparações antigênicas para reação de precipitação diante de soros positivos de pacientes com a PCM e a positividade do teste é indicado pela presença de linhas ou arcos de precipitação. (PUCCIA, 1990) (SIQUEIRA, A.M. 1982)

O método diagnóstico da imunodifusão dupla é um método que pode ser facilmente empregado em laboratórios por ser de relativo baixo custo e seus resultados de fácil interpretação e eficácia diagnóstica.(SVIDZINSKI, 1997) (SILVA, CHAMMA e FRANCO, 1989)

II. OBJETIVOS

1. Propor uma padronização na metodologia da produção de antígenos para diagnóstico da Paracoccidioidomicose;
2. Avaliar a qualidade dos lotes de antígenos preparados em três meios nutritivos distintos;
3. Validar a produção através do teste de imunodifusão dupla para implantação do teste para diagnóstico da micose no Paraná.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONDIÇÕES PARA O PREPARO DO EXOANTÍGENO BRUTO DE *Paracoccideoides brasiliensis*

1.1. Manutenção da cepa:

A cepa B339 de *P.brasiliensis* (procedente de A.Restrepo - Colômbia) gentilmente cedida pelo Laboratório de Ensino e Pesquisas em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, era mantida em meio sólido de Sabouraud, em sua fase leveduriforme com repiques semanais em tubo inclinado e meio fresco e cultivadas em estufa B.O.D. a 35°C.

1.2. Adaptação da cepa e preparo dos lotes de antígenos:

Foram utilizados três meios de cultura diferentes em composição, sendo considerados lotes individuais. A adaptação da cepa deu-se em meios sólidos inclinados (15ml/tubo), repicando com auxílio de alça de platina, parcelas da levedura sobre o meio. O procedimento era repetido a cada 6 dias e incubação a 35°C.

Para a produção do antígeno, foram utilizados meios líquidos, conforme descrição a seguir:

1.2.1. Meio de Negroni (Negroni, R. 1968) modificado por Siqueira (SIQUEIRA, A.M. 1982) (NGTA)

Neopeptone (DIFCO)	33,34g
Dextrose anidra (Reagen)	13,34g
Cloridrato de tiamina (Reagen)	0,1 g
L-Asparagina monohidrato (Isofar)	1,39g
Água destilada estéril	1000ml

A neopeptona era dissolvida a quente, em cerca de 50ml de água destilada e dialisada em membranas de diálise (Sigma) contra água destilada estéril por 5 horas a 70°C e depois de uma troca de água, por uma noite a 4°C. Depois de filtrado em papel de filtro qualitativo nº 1 (Whatmann), o conteúdo das membranas, servia para a diluição dos demais componentes. A L-asparagina era diluída separadamente, a quente. Volume completado com água destilada estéril para 1000ml, o meio era distribuído em frascos Erlenmeyer e autoclavado por 15 minutos e 121°C.

NOTA: para o meio sólido acrescentou-se 15g de ágar granulado para 1000ml de água; distribuído em tubos de ensaio 20x200 estéreis e autoclavado por 15 minutos a 121°C. Tubos inclinados até o completo resfriamento.

1.2.2. Meio de Tomate (UNTERKIRCEHR, 1988)

Deste meio de cultivo foi excluído o suco de tomate, pois este componente em nada influencia no desenvolvimento da cultura e excreção do antígeno pelo fungo.

Extrato de levedura (Oxoid)	6,1 g
Dextrose anidra (Reagen)	16,1 g
Peptona de caseína (DIFCO)	15,0 g
K ₂ HPO ₄	0,31 g
KH ₂ PO ₄	0,31 g
MgSO ₄ 7H ₂ O (Reagen)	0,12 g
MnSO ₄ H ₂ O (Reagen)	0,006g
NaCl (Reagen)	0,006g
Água destilada estéril para	1000 ml

O extrato de levedura, dissolvido na menor quantidade possível de água destilada era distribuída em sacos de diálise e dialisados contra água destilada estéril por 18 horas em geladeira, com duas trocas de água. O conteúdo das membranas era filtrado em papel de filtro qualitativo e a ele adicionados os demais componentes, sendo que os sais eram dissolvidos um a um em pouca água. Meio distribuído em frascos Erlenmeyer e autoclavados por 15 minutos a 121°C.

NOTA: para meio sólido, idem NOTA do item 1.2.1.

1.2.3. Meio YND (SVIDZINSKI, 1997)

Neopeptona (DIFCO)	15,0 g
Extrato de levedura (Oxoid)	5,0 g
Dextrose anidra (Reagen)	15,0 g

Água destilada estéril para 1000ml

Neopeptona era dissolvida a quente em pouca água e distribuída em sacos de diálise e dialisada contra água destilada estéril por 5 horas a 70°C e por uma noite, a 4°C, com uma troca de água. O conteúdo da membrana era filtrado em papel de filtro qualitativo e utilizado para a dissolução dos demais componentes. Volume completado para 1000ml, distribuído em frascos de Erlenmeyer e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C.

NOTA: para meio sólido, idem NOTA do item 1.2.1.

2. PREPARAÇÃO DOS LOTES DE ANTÍGENOS

2.1. Preparo dos pré-inóculos e inóculos:

Após dois a três repiques do fungo em meio sólido, observando que houve boa adaptação do fungo aos três meios de cultura, foram escolhidos 10-12 tubos de cada grupo, que apresentavam bom crescimento para o preparo do pré-inóculo. O crescimento leveduriforme era removido com auxílio de alça de platina em L, tomando-se cuidado para não ferir o meio, e então inoculado em meio líquido fresco (50ml em balão de fundo chato de 500ml), incubação por 3 dias em agitador com temperatura e rotação constantes (35°C e 70rpm).

Findo este período, os volumes dos balões eram vertidos em 450ml do meio líquido fresco em frascos Erlenmeyer de 2500ml e novamente levados à incubação em (Shaker) por 4 dias a 35°C e 70rpm. Em cada processo, foi realizada pesquisa de contaminantes em lâmina e lamínula ao microscópio óptico. Certificando-se da presença apenas de células leveduriformes de *P.brasiliensis*, passava-se à etapa seguinte.

Ao final do período de incubação dos inóculos, foi adicionado a cada lote, 0,1g de thimerosal diluído em pouca água e levados ao refrigerador por 48 horas. A seguir, os lotes foram filtrados 2 vezes e fracionados em frascos menores. Realizado o controle de viabilidade, coletando as células filtradas em Agar Sabouraud e deixando incubar por 7 dias a 35°C.

2.2. Concentração, diálise e liofilização:

Certificando-se não haver crescimento fúngico no controle de viabilidade, procedeu-se a concentração de lotes. Apenas alíquotas de 200ml de cada lote foi utilizado nos processos seguintes e o restante foi armazenado em freezer a -20°C.

Os lotes foram distribuídos em membrana de diálise e em bandejas contendo grânulos de Polietilenoglicol, deixados concentrar por 3-4 dias até um volume 10 vezes menor. Em seguida, cada lote sofreu diálise contra água destilada por 48 horas em geladeira com várias trocas de água para assim eliminar sais, resíduos do meio e o thimerosal.

O volume final ficou em torno de 80ml para cada lote, que foram acondicionados em frascos de 250ml para a liofilização.

3. IMUNODIFUSÃO DUPLA

3.1. Confeção das lâminas:

Seguindo-se basicamente a metodologia segundo Ouchterlony (1949) lâminas de vidro (76mm x 26mm) receberam pré-forragem de cerca de 1ml de ágar a 2% e depois de secas, nova camada 3ml de agarose 1% em solução salina 0,85%.

Após secagem de 1 hora em estufa, o gel de agarose foi perfurada com molde próprio. O esquema da lâmina matriz era de 1 orifício central e a 6mm distantes deste, 6 orifícios ao redor. Cada orifício tem capacidade para 10 μ l.

3.2. Titulação do antígeno:

Para se verificar qual a melhor concentração do antígeno produzido para utilização em testes de imunodifusão, as amostras liofilizadas foram diluídas em solução salina a 0,85%, a concentração final de 15mg/ml, 20mg/ml, 25mg/ml e 30mg/ml. No orifício central foi colocado soro positivo controle puro (com precipitinas anti-*P.brasiliensis*) e nos orifícios periféricos as diluições dos antígenos, acima preparadas. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente por 20 horas e após efetuada a 1^a

leitura, foram lavados em várias trocas de solução salina tamponada a 0,01M (PBS) sob agitação por 4 horas. Em seguida foram envoltas em papel de filtro umedecido em PBS e levados à estufa 37°C até estarem secas. As lâminas então já secas, foram coradas pelo Coomassie brilliant blue (Sigma) a 15% em solução de etanol: água destilada: ácido acético (4:4:1) sobre o papel de filtro (para evitar impregnação de resíduos do corante no gel, dificultando a leitura). Depois de retirado o excesso do corante, as lâminas foram lavadas com várias trocas de solução PBS.

Para testar a eficácia dos antígenos produzidos, foram colocados 10µl destes, no orifício central das lâminas e nos orifícios laterais, as diluições de soros controles positivos (1:2 a 1:32 em múltiplos de 2). O procedimento foi repetido para as 3 amostras de antígeno. Após 20 horas de incubação à temperatura ambiente, efetuada a leitura das lâminas, estas foram lavadas, secas e coradas, conforme descrição anterior, para a 2ª leitura.

IV. RESULTADOS

1. Obtenção do exoantígeno bruto:

O crescimento da levedura, cultivada em 3 meios sólidos diferentes, mostrou-se desigual, embora obedecidos tempo e temperatura de incubação.

O meio de Tomate, proporcionou crescimento mais abundante em menor tempo. Da mesma forma foi observado para o meio YND, no entanto, a levedura apresentava consistência mais cremosa e coloração mais clara. No meio de Negrone modificado o crescimento era menor aos 7 dias de incubação e a característica da levedura era a mesma citada para o meio YND.

O rendimento de cada lote de antígeno após a filtração do cultivo em meio líquido, foi de 450ml, dos quais, metade foram acondicionados em frascos de 500ml, lacrados e armazenados em freezer a -20°C . O restante, foi concentrado. Devido aos diferentes componentes dos meios nutritivos utilizados para o preparo dos antígenos, a concentração final das amostras também foi desigual.

Após diálise, o volume de cada amostra foi 100ml para o antígeno em caldo Tomate, 80ml para o antígeno em caldo Negrone e em caldo YND. No entanto, após liofilização, o antígeno de Negrone apresentou maior rendimento do que o antígeno produzido em meio Tomate.

2. Avaliação dos preparados antigênicos em teste de imunodifusão dupla:

Nenhuma das concentrações testadas em imunodifusão dupla, reagiu com as amostras de soro testadas. Supondo que talvez as amostras dos antígenos estivessem muito diluídas, foram preparadas novas amostras mais concentradas. Primeiro testamos uma concentração de 100mg de preparado de antígeno bruto liofilizado dissolvido em 1ml de salina a 0,85%. Desta vez a lavagem e coloração das lâminas não foram realizadas, pois poderia algum fator de impedimento estar atuando. Paralelamente, testamos um antígeno padrão como forma de comparar quaisquer resultados. Os soros utilizados foram os mesmos, nas mesmas titulações.

O resultado foi novamente negativo para o teste com o antígeno bruto preparado em meio de TOMATE, ou seja, nenhuma linha de precipitação foi detectada em relação as amostras dos soros. O antígeno em meio YND também não mostrou nenhuma linha clara de precipitação com os soros, apenas halos tênues ao redor dos orifícios onde foram colocados os soros. Estes halos não eram resultado de interação antígeno-anticorpo mas, provavelmente seriam lipídios do soro. Quanto ao preparado antigênico do meio de Negroni, este não reagiu com os soros. No entanto, halos bem evidentes apareceram ao redor dos orifícios periféricos contendo as amostras dos soros e ainda, fortes linhas externas a estes.

O teste com o antígeno padrão forneceu os resultados esperados, isto é, linhas de precipitação e identidade bem evidentes com os soros em teste, diluídos até 1:32.

Diante dos resultados obtidos e para procurar eliminar possíveis erros cometidos durante o preparo das lâminas, concentração e pipetagem dos reagentes, os testes foram repetidos quanto a análise quantitativa das amostras de antígenos utilizando as concentrações do primeiro teste, (15:1, 20:1, 25:1, 30:1 e 45:1) nos orifícios periféricos para reagir com a amostra de soro positivo no título de 1:16 (no centro). Após as 24 horas de incubação em câmara úmida e à temperatura ambiente. Efetuada a leitura, constatamos que os resultados foram novamente negativos para as 3 amostras de antígenos.

V. DISCUSSÃO

Alguns fatores são considerados de grande importância para a boa produção de antígenos: tempo e temperatura de incubação, meio de cultura utilizado para adaptação e preparo do inóculo, frasco ideal para a incubação do inóculo, o bom crescimento da cepa, e esta ser produtora de antígenos, concentração e armazenagem do preparado antigênico.

A metodologia adotada em relação a esses fatores, varia em cada laboratório assim como o do antígeno (filtrado bruto ou purificado da cultura miceliana ou levedurifera, ruptura de células) (SIQUEIRA, 1982).

A utilização de antígenos de filtrados de cultura leveduriforme do *Paracoccidioides brasiliensis* é bastante recomendada devido à sensibilidade e especificidade nas provas sorológicas (RESTREPO; CANO; OCHOA, 1984).

Optamos por utilizar antígenos de filtrados de cultura de *P. brasiliensis* e propor a padronização na técnica de imunodifusão dupla por ser esta mais simples e acessível e seus resultados de fácil interpretação.

Trabalhamos com a cepa B-339 do fungo conhecida como boa produtora de antígenos e o seu cultivo em meios de cultura de composições diferentes, deveu-se às informações divergentes quanto ao melhor substrato para o crescimento da levedura e produção do exoantígeno (FINQUELIEVICH, J.L. 1983)

O cultivo para adaptação da cepa nos meios de cultura de TOMATE, NEGRONI modificado e YND, foi iniciado com 2 tubos inclinados para cada meio e os repiques se deram a cada semana, sempre dobrando-se o número de tubos até atingirmos 16 tubos no 4º repique. Devido a alguma falha no preparo dos meios ou manipulação dos tubos, o último repique foi todo perdido, ou por contaminação bacteriana ou por não haver crescimento da levedura após o período de incubação.

Na segunda tentativa, os cuidados foram redobrados, tanto para o preparo dos meios como nos repiques. Ao terceiro repique, com doze tubos bem crescidos de cada meio, efetuamos a raspagem da levedura para a inoculação em meios frescos. Uma boa aeração é fator importante para o metabolismo do fungo, o que é dificultado quando o cultivo se dá em meio líquido. Desta forma, é necessário o uso de frasco apropriado (fundo chato e largo, possibilitando maior superfície de aeração) e incubação com agitação. Não dispúnhamos de frascos de Fernbach de 2800ml, ideais para o cultivo do inóculo, de modo que a incubação se deu em frascos de Erlenmeyer de 2000ml, em estufa com agitação constante.

Sais e impurezas provenientes dos meios de cultivo utilizados e dos reagentes químicos, podem interferir na concentração do produto final, de forma que se faz necessária a concentração e diálise do produto antes da liofilização.

Devido ao atraso no cronograma, não foi possível realizar a determinação de proteínas e carboidratos do preparado antigênico por análises físico-químicas, bem como a detecção da fração antigênica específica do *P.brasiliensis* (glicoproteína de 43

kd) por imunoeletroforese que teriam sido úteis na avaliação da qualidade e composição das amostras. Os resultados dos testes de imunodifusão dupla sugerem que, ou o fungo não produziu o antígeno nos meios em que foi cultivado, ou os preparados não possuem conteúdo antigênico satisfatório.

VI. CONCLUSÕES

É de real importância a pesquisa de antígenos e anticorpos envolvidos na manifestação da *Paracoccidioidomicose* e a padronização de um método diagnóstico eficiente se faz necessário tanto para a pesquisa da doença na população alvo quanto para o estudo desses reagentes.

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que:

1. O pré-inóculo poderia conter número de células leveduriformes insuficientes para a produção de antígenos.
2. O fungo pode não ter excretado o antígeno no meio de cultivo, por alguma interferência em seu metabolismo (algum componente do meio, esgotamento por excesso de repiques) ou ter excretado um conteúdo muito baixo.
3. Acondicionamento e armazenamento impróprios podem ter de algum modo desativado a fração antigênica (glicoproteína excretada).
4. Os testes negativos não devem ser por problemas técnicos, pois o mesmo procedimento foi utilizado com o antígeno padrão e este forneceu os resultados esperados.
5. O teste realizado com antígeno padrão, indicou-nos que os soros em teste continham anticorpos precipitantes para o *P. brasiliensis*.

6. Se faz necessário dar continuidade aos estudos iniciados, bem como realizar novos testes e análises mais apuradas a fim de aprimorar as técnicas utilizadas visando a padronização da produção de antígenos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUMMER, E. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. Mycopathologia, N.109, p.13-17, 1990.
- CAMARGO, Z.P. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens of immunodiffusion test. J.Clin.Microbiol., v.29, p.31-38, 1991.
- CANO, M.I.N., VIDAL DE AGUIAR, M.S.M. Utilização de aminoácidos no estudo do crescimento *P.brasiliensis*. Influência sobre o dimorfismo. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v.33(04), p.3119-324, jul/ago 1991.
- _____. Estudo das necessidades auxotróficas do *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v.31(07), p.100, 1989.
- CRUZ, M.F.F., CASTRO, B.G.; WANKE, B. Produção e padronização dos antígenos de *P.brasiliensis*, *H.capsulatum* e *A.fumigatus* para uso no imunodiagnóstico. Comparação entre as técnicas de imunodifusão e imunoeletroosmoforese. Rev. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.80(3), p.301-305, jul/set. 1985.
- DEL NEGRO, G.M.B. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological test used in the diagnosis *Paracoccidioidomycosis*. Rev. Inst. Med. tro. São Paulo, v.33(4), p.227-280, jul/ago. 1991.
- DELACRÉTAZ, J.; GRIGORIU, D.; DUCEL, G. Atlas de Micologia Médica. São Paulo: Mandé, 1978.
- FINQUELIEVICH, J.L., et al. Estudio comparativo de la patogenicidad y la antipatogenicidad de 6 cepas de *P.brasiliensis*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v.35(6), p.535-541, nov/dez. 1993.
- JAWETZ, Ernest et al. Microbiologia Médica. 18 ed. Guanabara Koogan, 1991.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Técnicas micológicas e imunológicas. Micología Médica. 8º ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- LÓPEZ-MARTINEZ, R.; CASTAÑÓN, L.R.O.; RÉBORA, F.MAYNEZ, A.M.G.; VERTIZ, E. Diagnóstico serológico de micosis pulmonares por oportunistas. Rev. Lat. Amer. Microbiol., v.30, p.317-320, 1988.
- MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DELNEGRO, G.B.; SIQUEIRA, A.M. Serodiagnosis. In: FRANCO, M. et al. *Paracoccidioidomycosis*, Flórida: CRC Press, 1994. p.345-362.
- MINGUETTI, G. et al. Ultraestrutura do *Paracoccidioides brasiliensis*. I. Na fase filamentosa. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v.25(4), p.152-160, jul/ago, 1983.
- _____. Ultraestrutura do *Paracoccidioides brasiliensis*. II. Na fase leveduriforme. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v.25(4), p.161-167, jul/ago, 1983.
- MONTENEGRO, M.R.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K.I.; HOKIE, Y.; MENDES, R.P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D.; Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, stat of São Paulo, Brazil, an Endemic area of

- Paracoccidioidomycosis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.97(6), p.665-670, nov/dez, 1996.
- PUCCIA, Rosana. Estudos bioquímico e imunoquímicos sobre gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, 1990. Tese (doutorado) Escola Paulista de Medicina.
- _____. Purification of the 43kda glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). J.Med. Vet. Micol., v.29, p.57-60, 1991.
- RETREPO, A.; CANO, L.E.; OCHOA, M.T. A yeast derived antigen from *P.brasiliensis* useful for serological testing. Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol., v.22, p.23-29, 1984.
- SILVA, M.I.C.; CHAMMA,L.G.; FRANCO,M. Reação de microimunodifusão em gel de ágar no diagnóstico sorológico do *paracoccidioidomicose* Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v.31(1), p.40-43, jan/fev, 1989.
- SIQUEIRA, Antonio Martins. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose: caracterização imunoquímica do antígeno E₂ do *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, 1982. Tese (doutorado) Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo.
- SOMENSI, C.S.; CAMARGO, Z.P.; OLIVEIRA,O.L.P.; INOUE,M.; PONTELLO,R.; ITANO,E. Reavaliação e proposta de um protocolo de sorologia para *Paracoccidioidomycose*. RBAC, v.28(2), p.49-52, 1996.
- _____; SOMENSI,D.; ITANO,E.; QUESADA,R.M.B.; CAMARGO,Z.P.; INOUE,M.; OLIVEIRA,O.L.P. A *Paracoccidioidomycose* na região norte do Paraná: Dados Clínicos-Laboratoriais. NerosLab, 20 ed., p.100-105, 1997.
- SVIDZINSKI, T.I.E.; DIAS-SIQUEIRA,V.L.; OLIVEIRA,T.C.R.M.; HERRERO,F. Importância da Imunodifusão Radial Dupla no Diagnóstico e Acompanhamento de pacientes com *Paracoccidioidomycose*. NerosLab, 20 ed., p.66-70, 1997.
- UNTERKIRCHER, Carmelinda Schmidt. Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e sua aplicação no diagnóstico sorológico da *Paracoccidioidomycose*. São Paulo, 1988. Tese (doutorado) Escola Paulista de Medicina.