

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Vanda de Sá LIRIO(1), Cezar Mendes de ASSIS(2), Maria Isabel N.CANO(1) & Carlos da Silva LACAZ(1)

RESUMO

Antígenos de três amostras de *A. fumigatus* (354, 356, JIG) e antissoro contra a mistura destes antígenos foram produzidos e avaliados imunoquimicamente. Os antígenos de filtrado de cultura foram obtidos após concentração com acetona conforme adaptação da técnica descrita por Coleman & Kaufman. Em prova de ID obteve-se 100% de positividade com os soros de pacientes com aspergilose estudados. Com relação aos soros heterólogos encontramos reatividade com soro de um paciente com candidíase e com soro de um paciente com histoplasmose; foi encontrado padrão idêntico de resposta quando se utilizou o antígeno de referência. O antissoro foi titulado por ID, CIE e RFC^{MI} contra o antígeno específico apresentando títulos respectivos de 1:32, 1:32 e 1:128, e utilizado para reagir contra o mesmo antígeno por IEF, demonstrando 8 linhas de precipitação, sendo 5 na região anódica e 3 na região catódica. O perfil de bandeamento do antígeno em eletroforese utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5% apresentou-se complexo com 26 sub-unidades protéicas, cujos pesos moleculares variaram de 18 a > 100kDa. Quando estes componentes foram eletrotransferidos e reagidos com o antissoro específico ("immunoblotting"), verificou-se imunogenicidade em todas as frações bandeadas.

UNITERMOS: Antígeno; Antissoro; *Aspergillus fumigatus*

INTRODUÇÃO

Aspergillus fumigatus é o principal agente etiológico da aspergilose, doença de distribuição universal, acometendo principalmente o pulmão¹⁴. Normalmente é responsável por infecções secundárias invasivas que afetam pacientes com outras doenças crônicas debilitantes ou recebendo prolongada terapia imunossupressora.

Um dos principais problemas médicos do século XX é a ocorrência de infecções oportunistas, sendo que o *A. fumigatus* é um dos agentes mais encontrados em indivíduos com doença de base (como tuberculose e neoplasia), em indivíduos imunocomprometidos como transplantados fazendo uso de drogas (imunossupressoras, anti-inflamatórios e agen-

tes quimioterápicos) e em infectados pelo vírus da AIDS.

O diagnóstico da aspergilose tem sido feito por métodos micológicos e histológicos clássicos, mas nem sempre se conseguem bons resultados. Métodos sorológicos são utilizados com o intuito de se fazer o diagnóstico e prognóstico dessa doença. As provas sorológicas aconselhadas são ID^{4,10,13} e CIE^{10,13}, que demonstram linhas de identidade, títulos críticos e soroconversão.

A obtenção de antígenos é de fundamental importância em testes sorológicos, pois diferenças qualitativas e quantitativas entre os lotes produzidos separadamente afetam diretamente a sensibilidade e especificidade do

1. Laboratório de Micologia Médica – LIM 53 – do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

2. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Vanda de Sá Lirio, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Micologia Médica – LIM-53. Av. Dr. Arnaldo, 455 – 2º andar. 01246 São Paulo, SP, Brasil.

método¹⁰. Especificidade de 100% em prova de ID pode ser garantida com o uso de antissoros de referência⁴.

Pretendemos nesse trabalho obter antígenos parcialmente purificados, segundo a adaptação da técnica descrita por COLEMAN & KAUFMAN⁴, e antissoros específicos que apresentem resposta idêntica a reagente de referência, utilizados no diagnóstico de aspergilose causada por *Aspergillus fumigatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRAS DE ASPERGILLUS FUMIGATUS: foram utilizadas 3 amostras, 354 e 356 provenientes da Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; e J.I.G. gentilmente cedida pela "Corporación para Investigaciones Biológicas. Hospital Pablo Tobon Uribe", Medellín – Colombia.

2. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO: para a obtenção dos antígenos adaptamos a técnica descrita por COLEMAN & KAUFMAN⁴. Efetuaram-se 3 repiques consecutivos de 3 dias, a 31 °C, em ágar-Sabouraud para adaptação das amostras. Do último crescimento foram transferidos blocos de ágar de aproximadamente 0,5 cm² de cada amostra para frascos Erlenmeyer contendo 250 ml de caldo-Sabouraud. O crescimento ocorreu em fase estacionária, a 31 °C, por 4 semanas. Após este período acrescentou-se mertiolato, obtendo-se concentração final de 1:5000 e estocou-se em geladeira por 7 dias e depois de filtrado, desprezou-se o micélio. Acrescentou-se, gota a gota, volume duas vezes maior de acetona ao filtrado sob agitação constante a 4 °C. Após esta etapa continuou-se a agitação por mais 15 minutos. Centrifugou-se a mistura a 3.000 rpm por 50 min. a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi acondicionado a 4 °C para total evaporação da acetona. Ressuspendeu-se o precipitado em água destilada estéril, para uma concentração final de 1:10 do volume original de filtrado; homogenizou-se suavemente para solubilização e centrifugou-se a 3.000 rpm por 50 minutos. O precipitado insolúvel foi desprezado e o sobrenadante (antígenos) armazenado a 4 °C. A mistura dos sobrenadantes das três amostras foi utilizada como antígeno para obtenção de antissoros policlonal avaliando-se os mesmos frente aos testes sorológicos descritos a seguir.

3. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS: o conteúdo de proteínas e carboidratos totais foi determinado através das técnicas descritas por LOWRY et al.¹⁶ e SCOTT & MELVIN (antrona)²², respectivamente. Usou-se como padrão albumina bovina para proteína e glicose para carboidrato.

4. OBTENÇÃO DE ANTISSORO: dois coelhos machos, Nova Zelândia, de 3 kg de peso foram inoculados via subcutânea, com 0,5 ml da mistura dos antígenos obtidos das 3 amostras de *A. fumigatus* emulsionado com 0,5 ml de adjuvante completo de Freund (Difco, USA). Foram realizadas 8 inoculações, três por semana. Doze dias após a última inoculação fez-se a sangria total dos animais.

5. PROVAS SOROLÓGICAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO E DO ANTISSORO OBTIDOS.

IMUNODIFUSÃO DUPLA DE OUCHTERLONY (ID): conforme descrita por OUCHTERLONY¹⁸. As lâminas foram coradas pelo corante "Coomassie brilliant blue R-250" (Sigma) e descoradas com 45% de etanol absoluto, 10% de ácido acético glacial e 45% de água destilada. Avaliou-se a mistura dos antígenos (354, 356, JIG) de *A. fumigatus* obtidos e os respectivos soros humanos: 12 de pacientes com aspergilose, 11 de pacientes com histoplasmoses, 11 de pacientes com paracoccidioidomycose, 12 de pacientes com proteína C reativa e 12 de doadores normais. Através também da ID foi realizada titulação do antissoros frente à mistura antigênica. Realizou-se avaliação comparativa entre a mistura antigênica e o antissoros frente a reagentes (antígeno e antissoros) de referência, gentilmente fornecidos pelo "Department of Health and Human Services -- Public Health Service -- Centers for Diseases Control", Atlanta, Georgia, USA.

CONTRAIMUNOELETOFORESE (CIE): baseada na descrição original de BUSSARD³ e a coloração das lâminas conforme descrito para ID. A CIE foi utilizada para titulação do antissoros frente à mistura antigênica.

IMUNOELETOFORESE (IEF): conforme descrita por SCHEIDEGGER²⁰ e coloração das lâminas conforme descrito para ID. Foi realizada IEF da mistura antigênica contra o

antissoro produzido e contra um soro de paciente com aspergilose.

REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO – MICRO TÉCNICA (RFC^M): foi realizada segundo a padronização da Organização Panamericana da Saúde⁹. Para obtenção do título do antissoro e do antígeno, tais reagentes foram testados em várias diluições a partir de 1:8 até 1:1024.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE): o perfil eletroforético dos antígenos foi determinado a partir de géis de SDS-PAGE, segundo LAEMMLI¹⁵, com gel de separação à 12,5% e gel de empilhamento à 5%. Os géis foram corados pelo nitrato de prata. O padrão de peso molecular utilizado continha variação de 20-94 kDa (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

“IMMUNOBLOTTING”: após a separação da mistura dos antígenos em SDS-PAGE, a transferência para o papel de nitrocelulose e a reação com os soros foi realizada como descrito por TOWBIN et al²⁴. A transferência das proteínas para o papel de nitrocelulose (Millipore HATF-151) ocorreu na presença de tampão de transferência (20% metanol, 25mM Tris base, 192 mM glicina) pH 8,3, por 18 horas a 18V. Após a transferência, o papel de nitrocelulose foi saturado com solução de leite desnatado a 5% em PBS-TWEEN 20 (10 mM tampão fosfato -0,15M NaCl – 0,1% Tween 20) por 4 horas. Analisou-se amostra de soro de coelho normal e o antissoro específico; ambos nas diluições de 1:50 a 1:400. Incubou-se, por 2 horas, os soros em PBS-TWEEN 20-GELATINA (PBS-TWEEN 20 – 10% gelatina). Posteriormente, incubou-se por 2 horas com a imunoglobulina IgG de cabra anti-coelho marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluída 1:500 em PBS-TWEEN 20-GELATINA. As fitas de nitrocelulose foram lavadas e a atividade da peroxidase revelada com 5 mg de 3,3 diaminobenzidina (Sigma) em 50 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e 5 µl de H₂O₂ (30 volumes).

RESULTADOS

1. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS: os conteúdos de proteínas dos antígenos variaram de 580 a 1.080 µg/ml

e o conteúdo de carboidratos de 700 a 1.000 µg/ml conforme descrito na Tabela 1.

2. AVALIAÇÃO DA MISTURA ANTIGÊNICA: os resultados da ID realizada com a mistura antigênica e os soros humanos encontram-se na Tabela 2. Na ID obtivemos 100% de positividade quando a mistura antigênica foi testada frente aos soros de pacientes com aspergilose estudados. Um soro de paciente com candidíase e um soro de paciente com histoplasmosse apresentaram reatividade em ID. Mesmo após reavaliação desses 2 soros com os reagentes de referência e lavagem das lâminas em citrato de sódio a 5%, reações inespecíficas foram observadas em ID. As linhas de precipitação destes 2 soros não apresentavam identidade entre si e não apresentavam identidade com o antissoro de referência e com o antissoro produzido neste trabalho. Quando comparamos em ID os antígenos e o antissoro, acima descritos, encontramos respostas tão intensas quanto aos reagentes de referência (Figura 1). A mistura antigênica apresentou em RFC^M título ideal na diluição 1:512.

TABELA 1
Concentração de proteínas e carboidratos totais

ANTÍGENOS	PROTEÍNAS µg/ml	CARBOIDRATOS µg/ml
354	580	700
356	740	700
JIG	1.080	1.000
Mistura antigênica	800	800

TABELA 2
Resultados da Imunodifusão dupla de Ouchterlony realizada com a mistura antigênica e soros humanos

SOROS HUMANOS	TOTAL SOROS	SOROS REATIVOS
Aspergilose	12	12
Histoplasmosse	11	01
Candidíase	11	01
Paracoccidioidomicose	12	–
Proteína C reativa	12	–
Normais	12	–

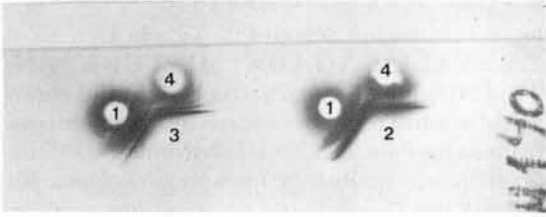


FIG. 1 – Imunodifusão dupla de Ouchterlony entre antígeno e antissoro frente a reagentes de referência. 1. antissoro de *A. fumigatus*; 2. mistura dos antígenos das 3 amostras de *A. fumigatus*; 3. antígeno de *A. fumigatus* de referência; 4. antissoro de *A. fumigatus* de referência.

3. AVALIAÇÃO DO ANTISSORO: a titulação do antissoro frente à mistura dos antígenos demonstraram títulos nas seguintes diluições: ID – 1:32; CIE – 1:32; RFC^{MI} – 1:128.

4. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS REAGENTES: observamos através de IEF, com antissoro de coelho contra *A. fumigatus*, a presença de 8 arcos de precipitação, sendo 5 na região anódica e 3 na região catódica. Com relação ao soro de paciente com aspergilose estudado encontramos 4 arcos de precipitação, todos na região anódica, coincidentes com os apresentados pelo antissoro específico (Figura 2). O perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12,5%, dos antígenos, apresentaram variação de peso molecular de 18 a > 100 kDa, com cerca de 26 sub-unidades protéicas (Figura 3). O antígeno produzido com a amostra JIG foi o que apresentou perfil eletroforético mais complexo e com sub-unidades protéicas mais densamente coradas.

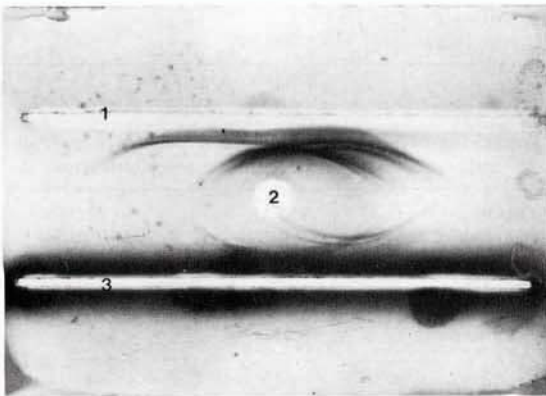


FIG. 2 – Imunoeletroforese da mistura dos antígenos das três amostras de *A. fumigatus*. 1. canaleta contendo antissoro de *A. fumigatus*; 2. orifício com a mistura antigênica; 3. canaleta contendo soro de um paciente com aspergilose.

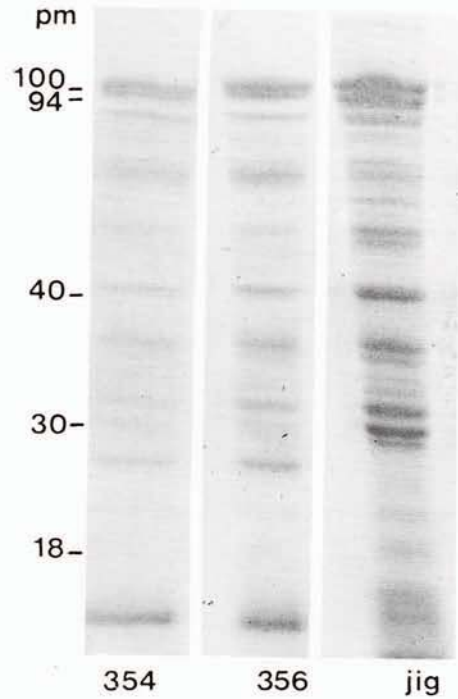


FIG. 3 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE para cada antígeno de *Aspergillus fumigatus*. Corado pelo nitrato de prata.

5. “IMMUNOBLOTTING”: através do “immunoblotting” da mistura antigênica ensaiada com o antissoro específico, observamos imunogenicidade em todas as sub-unidades protéicas separadas em SDS-PAGE (Figura 4) não se verificando diminuição da intensidade de reação nas diluições estudadas. A análise do soro controle do coelho revelou reatividade fraca com algumas frações, o que era quase imperceptível na diluição 1:400. Apesar da reatividade em comum (soro normal e antissoro) o antissoro específico apresentava reação com intensidade muito maior.

DISCUSSÃO

Métodos sorológicos têm se mostrado úteis no diagnóstico da aspergilose, quando os métodos convencionais (exame direto e cultura) são duvidosos ou de difícil realização. Várias provas sorológicas têm sido estudadas, tais como reação de fixação de complemento^{1,7}, imunodifusão^{2,19,23}, aglutinação em látex⁸, testes eletroforéticos e radioimunoeletroforese

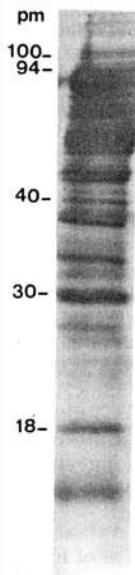


FIG. 4 – “Immunoblotting” – Mistura dos antígenos das três amostras frente ao antissoro de *A. fumigatus*

cruzadas^{6,11,12,20}, ELISA^{5,7} e “immunoblotting”^{12,17,25}.

A busca de um teste específico, sensível, de fácil realização e acessível a grande número de laboratórios de rotina em Micologia tem focalizado a ID como alternativa⁴. Vários são os antígenos descritos na literatura^{1,2,4,5,8,18} utilizados na prova de ID. BROUWER (1988) comparou a detecção de anticorpos anti-*A. fumigatus* nas provas de ID, ELISA e “Immunoblotting”, encontrando boa correlação entre ID e ELISA quando o soro de paciente continha altos níveis de anticorpos. Verificando que a maioria dos soros com fraca positividade em ID, quando foram titulados em ELISA apresentavam títulos dentro do normal e mostravam padrões em “immunoblotting” normais.

Antígenos de *Aspergillus* padronizados e reprodutíveis, que não reagem com a proteína C, foram preparados por extração com acetona, de filtrados de cultura de 5 semanas de crescimento em meio líquido de Sabouraud por COLEMAN & KAUFMAN⁴.

Com o intuito de produzir antígeno e antissoro com características idênticas aos produzidos por COLEMAN & KAUFMAN⁴, sendo também considerados de referência para ID, adaptamos sua metodologia à realidade de nosso laboratório.

Para COLEMAN & KAUFMAN⁴ o teste da ID mostrou-se 100% específico quando utili-

zado com soro de referência. O aparecimento de outras linhas de precipitação podem ocorrer com soro de pacientes com aspergilose, mas um diagnóstico específico só pode ser feito na presença de identidade entre o soro de referência e a amostra estudada. Soros de pacientes com candidíase e histoplasmose podem conter precipitinas reativas com precipitonogênios de *Aspergillus*. Em nossos experimentos encontramos positividade com um soro de paciente com histoplasmose e com um de candidíase o que foi confirmado utilizando-se antígeno de referência, mas as linhas de precipitação encontradas não apresentavam identidade com o antissoro padrão e com o antissoro produzidos neste trabalho.

Na ID realizada entre a mistura dos antígenos e o antissoro produzidos, frente aos reagentes de referência, obtivemos resposta mais intensa com os reagentes por nós produzidos, observando, porém, padrão semelhante de resposta.

Todas as provas utilizadas neste trabalho, demonstraram a antigenicidade e a complexidade dos preparados. Têm sido demonstrado que os componentes antigênicos do *A. fumigatus* variam entre cepas, fases de crescimento e meio de cultura^{11,21}.

Conforme descrito na literatura existe variabilidade de amostras que interferem na eficiência dos antígenos obtidos²¹. Em nosso trabalho obtivemos melhores resultados quando a amostra utilizada era a JIG. Testes com outros meios de cultivos para produção de antígenos de *A. fumigatus* (dados ainda não publicados) confirmam estes resultados.

A metodologia utilizada na obtenção dos antígenos e do antissoro apresentaram resultados que nos permitiram utilizá-la em rotina sorológica de triagem diagnóstica e no acompanhamento de controle de cura de pacientes com aspergilose nas provas de ID, CIE e RFC^{MI}.

SUMMARY

Obtention and evaluation of *Aspergillus fumigatus* antigens extraction

Antigens from three strains of *Aspergillus fumigatus* (354, 356, and JIG) and an antiserum against the mixing of these antigens have been produced, and evaluated immunochemically. The antigens were obtained through a modified Coleman & Kaufman technique (culture

filtrate concentrated by acetone). Analysis by the immunodiffusion test (ID) against homologous serum has yielded 100% sensitivity (with the studied sera). Concerning heterologous sera we found reactivity with a serum of a patient of candidiasis and another with histoplasmosis. The same result was obtained with a reference antigen in immunodiffusion, showing similar standards of response. Titration of the antiserum by ID and counterimmunoelectrophoresis showed a titre of 1:32, and by complement fixation (micro-technique) a titre of 1:128. Using immunoelectrophoresis (IEF), the produced antiserum yielded 8 lines of precipitation (5 in the anodic pole and 3 in the cathodic one). In SDS-PAGE at 12.5% the antigen has presented a rather complex electrophoretic profile (26 proteic subunits with a molecular weight ranging from 18 a > 100 kDa). Immunogenicity of the antigen was observed in all fractions of SDS-PAGE when the immunoblotting against the antiserum was carried out.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Gildo Del Negro pela tradução do resumo para o inglês. Agradecemos ao Departamento de Documentação Científica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela elaboração das fotografias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIGUET, J.; FRUIT, J.; VERNES, A. & CAPRON, A. – La reaction de fixation du complement et l'immunoelectrophorese appliquees au diagnostic immunologique de l'aspergillose pulmonaire. *Rev. Immunol.*, 34: 193-204, 1970.
2. BROUWER, J. – Detection of antibodies against *Aspergillus fumigatus*: comparison between double immunodiffusion, ELISA and immunoblot analysis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 85: 244-249, 1988.
3. BUSSARD, A. – Description d'une technique combinant simultanément l'electrophorese et la precipitation immunologique dans un gel: l'electrosynérese. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 34: 258-260, 1959.
4. COLEMAN, R.M. & KAUFMAN, L. – Use of the Immunodiffusion Test in the Serodiagnosis of *Aspergillus*. *Appl. Microbiol.*, 23: 301-308, 1972.
5. HARVEY, C. & LONGBOTTOM, J.L. – Development of a sandwich ELISA to detect IgG and IgG sub-classes antibodies specific for a major antigen (Ag 7) of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Allergy*, 16: 323-330, 1986.
6. HARVEY, C. & LONGBOTTOM, J.L. – Characterization of a major antigenic component of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. exp. Immunol.*, 65: 206-214, 1986.
7. HARVEY, C.; SHAW, R.J. & LONGBOTTOM, J.L. – Diagnostic specificity of a sandwich ELISA for *Aspergillus* related diseases. *J. Allergy clin. Immunol.*, 79: 324-330, 1987.
8. HIPPI, S.S.; BERNS, D.S.; TOMPKINS, V. & BUCKLEY, H.R. – Latex slide agglutination test for *Aspergillus* antibodies. *Sabouraudia*, 8: 237-241, 1970.
9. KAUFMAN, L.; HUPPERT, M.; FAVA NETTO, C.; NEGRONI, R. & RESTREPO, A. – Manual of standardized serodiagnostic procedures for systemic mycoses. Part I: Agar gel immunodiffusion tests. Part II: Complement fixation test. Washington, Pan American Health Organization, 1972.
10. KAUFMAN, L. – Value of Immunodiffusion Tests in the Diagnosis of Systemic Mycotic Diseases. *Ann. clin. Lab. Sci.*, 3: 141-146, 1973.
11. KAUFFMAN, H.F. & DE VRIES, K. – Antibodies against *Aspergillus fumigatus*. I. Standardization of the antigenic composition. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 62: 252-264, 1980.
12. KAUFFMAN, H.F. & DE VRIES, K. – Antibodies against *Aspergillus fumigatus*. II. Identification and quantification by means of crossed immunoelectrophoresis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 62: 265-275, 1980.
13. KAUFFMAN, H.F. & BEAUMONT, F. – Serological diagnosis of *Aspergillus* infections. *Mycoses*, 31: 21-26, 1988.
14. LACAZ, C.S.; PORTO, E. & MARTINS, J.E.C. – *Micologia Médica: fungos, actinomicetos, e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo, Sarvier, 1991.
15. LAEMMLI, U.K. – Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
16. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. – Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
17. MATHEUS, R.; BURNIE, J.P.; FOX, A. & TABAQCHALI, S. – Immunoblot analysis of serological responses in invasive Aspergillosis. *J. clin. Path.*, 38: 1300-1303, 1985.
18. OUCHTERLONY, O. – Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 6: 30-154, 1962.
19. PARKER, J.D.; SAROSI, G.A.; DOTO, I.L. & TOSH, F.E. – Pulmonary aspergillosis in the South Central United States. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 101: 551-557, 1970.

20. SCHEIDEGGER, J.J. – Une micro-methode de l'immunoélectrophorese. *Int. Arch. Allergy*, 1: 103-105, 1955.
21. SCHONNHEYDER, H. – Pathogenetic and serological aspects of pulmonary aspergillosis. *Scand. J. infect. Dis.*, 51(Suppl.): 1-62, 1987.
22. SCOTT, T.A. & MELVIN, E.H. – Determination of dextran W-th anthrone. *Analyt. Chem.*, 25: 1656-1661, 1953.
23. STAIB, F.; FOLKENS, U.; TOMPAK, B.; ABEL, Th. & THIEL, D. – A Comparative study of antigens of *Aspergillus* isolates from patients and soil of ornamental plants in the Immunodiffusion test. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 242: 93-99, 1978.
24. TOWBIN, H.; STAEBELIN, T. & BORDON, J. – Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 76: 4350-4354, 1979.
25. YU, B.; NIKI, Y. & ARMSTRONG, D. – Use of Immunoblotting to detect *Aspergillus fumigatus* antigen in sera and urines of rats with experimental invasive Aspergillosis. *J. clin. Microbiol.*, 28: 1575-1579, 1990.

Recebido para publicação em 19/12/1991

Aceito para publicação em 04/06/1992