

PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS, NOVA AMOSTRA ISOLADA DE FEZES DE UM PINGUIM (*PYGOSCELIS ADELIAE*)

Nilma Maciel GARCIA (1), Gilda Maria Barbaro DEL NEGRO (1), Elisabeth Maria HEINS-VACCARI (1), Natalina Takahashi de MELO (1), Cezar Mendes de ASSIS (2) & Carlos da Silva LACAZ (1)

RESUMO

Os Autores apresentam os resultados obtidos com a amostra "pinguim" de *Paracoccidoides*, isolada por GEZUELE et al. (1989) na Antártica uruguaia.

Das fezes de um desses animais, foi isolado um fungo considerado, recentemente, como nova espécie de *Paracoccidoides* - *P. antarcticus*.

Os exames micológico e imunoquímico demonstraram tratar-se de *Paracoccidoides brasiliensis*, inclusive com a verificação da presença da glicoproteína 43 kDa pelos métodos de imunodifusão dupla, SDS-PAGE e imunoeletroforese. A possibilidade de se tratar de uma variedade do *Paracoccidoides brasiliensis* somente poderá ser confirmada através de outros estudos baseados na chamada taxonomia molecular, incluindo cariotipagem.

Os Autores registram o significado epidemiológico deste achado, sugerindo uma revisão nos conhecimentos do nicho ecológico do *P. brasiliensis*.

UNITERMOS: *Paracoccidoides antarcticus*; *Paracoccidoides brasiliensis*; Pinguim.

INTRODUÇÃO

Em 1989, GEZUELE⁸, do Instituto de Higiene de Montevideo (Uruguai), isolou das fezes de um pinguim (*Pygoscelis adeliae*) procedente da Antártica uruguaia, fungo dimórfico semelhante ao *Paracoccidoides brasiliensis* (IHM-1962). No mesmo ano, CALEGARI et al. (1989)², realizaram estudo imunoquímico, com a demonstração de identidade, por prova de imunodifusão dupla, entre a amostra "pinguim" e uma de *P. brasiliensis*.

Em 1991 e 1992 CAMARGO et al.^{3,4}, obtendo exoantígenos desta amostra e comparando-a com uma cepa típica de *P. brasiliensis* (B-339), verificaram identidade total, principalmente com a gp 43kDa, específica do *P. brasiliensis*.

Esta amostra (IHM-1962) nos foi cedida em Montevideo, a 25/5/1989 por GEZUELE, com o objetivo de ser também estudada e caracterizada do ponto de vista micológico e imu-

noquímico. Através de resultados preliminares, GARCIA et al. (1991, 1992)^{6,7} também consideraram a referida amostra como *P. brasiliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo do fungo: a amostra "pinguim" (nº 927 da Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo) foi cultivada em meio BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO) por 10 dias a 37°C para obtenção da fase leveduriforme (Y) e em ágar-Sabouraud por 30 dias a 25°C para obtenção da fase miceliana (M), com o intuito de caracterizar o dimorfismo. Foram realizados exames macro e microscópico de ambas as formas.

Inoculação: cobaios machos de 100 a 200 g foram inoculados por via intratesticular com 0,25ml de uma suspensão da amostra "pinguim" na fase miceliana, previamente cultivada em ágar BHI a 25°C. Após 15 dias da inoculação, os animais foram sacrificados e o testículo

(1) Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e LIM-53 (HC-FMUSP)

(2) Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Endereço para correspondência: Nilma Maciel Garcia, Faculdade de Medicina da USP (LIM-53), Av. Dr. Arnaldo, 455, 2º and. CEP 01246 São Paulo, SP, Brasil.

retirado para a realização de exame histopatológico.

Produção de exoantígenos: a amostra "pinguim" foi cultivada em meio NGTA (neopeptona 1,6%; glicose 1,0%; tiamina 0,01%; asparagina 0,02%)⁵, a 37°C, sob agitação constante, durante períodos de 5, 10, 15, 20 e 30 dias e, a 25°C, por 30 dias. Decorridos os períodos de crescimento, as culturas foram mortas pelo timerosal na concentração final de 1:5000, filtradas em papel de filtro "Whatman nº 1", dialisadas, concentradas 10 vezes e mantidas a 4°C até o momento do uso. Os exoantígenos foram então submetidos à dosagem de proteínas pelo método de LOWRY¹².

Imunodifusão dupla (IDD): os exoantígenos foram avaliados por IDD13, frente a soro anti-gp 43 kDa e de indivíduos portadores de paracoccidioidomicose, para verificação da formação de linha de identidade com antígeno de *P. brasiliensis* obtido da amostra nº 113 FMUSP (antígeno de referência). Foram adicionados aos orifícios do gel 12µl dos soros e dos antígenos.

SDS-PAGE: os exoantígenos obtidos após 10 e 20 dias de crescimento na fase Y e 30 dias na fase M foram analisados quanto ao perfil eletroforético de suas proteínas, através da técnica de SDS-PAGE, descrita por LAEMMLI (1970)¹¹. Alíquotas de 300µl dos antígenos obtidos da amostra "pinguim", bem como do antígeno de *P. brasiliensis* (113-FMUSP) foram precipitadas com ácido tricloroacético a 10% e os precipitados lavados com acetona¹; após eliminação do excesso de acetona, os resíduos foram ressuspensos em 50µl de solução-tampão da amostra e adicionados aos "slots" do gel a 12,5%.

Imunoeletroforese: os exoantígenos foram analisados frente a soro de coelho anti-*P. brasiliensis* e "pool" de soros de pacientes com paracoccidioidomicose, segundo metodologia descrita por SIQUEIRA (1982)¹⁴.

RESULTADOS

Estudando a amostra "pinguim" verificamos:

- a) dimorfismo M-Y (Fig. 1)
- b) na fase M, presença de clamidoconídios intercalares e terminais, com abundância de filamentos micelianos (Fig. 2).

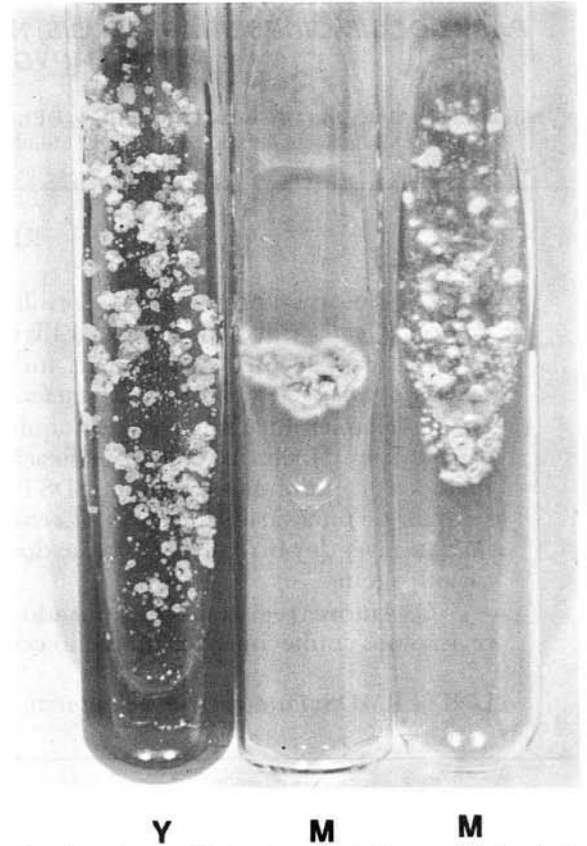


Fig. 1 - *Paracoccidioides brasiliensis* (amostra "pinguim"). Fase Y (10 dias de cultivo a 37°C) obtida em ágar BHI. Fase M (30 dias de cultivo, temperatura ambiente, em ágar Sabouraud).

- c) na fase Y, elementos arredondados, com gêmulas, algumas ovaladas, um pouco diferentes das observadas em *P. brasiliensis* (Fig. 3).
- d) com a inoculação da fase M em testículo de cobaio, obtivemos orquite com riqueza de parasitos nas lesões, nítidos brotamentos e pseudomicélio, presença de tubos germinativos e blastoconídios em forma de "halteres" (Figs. 4, 5 e 6). O relatório histopatológico mostrou que o testículo estava em grande parte substituído por grande abscesso, com muitos neutrófilos íntegros e degenerados, circundado por reação granulomatosa, formada por macrófagos com diferenciação epitelióide e células gigantes do tipo corpo estranho e Langhans. Em torno, fibrose e denso infiltrado à custa de linfócitos e poucos plasmócitos. O testículo remanescente apresentava perda da espermatogênese, fibrose do interstício e da basal dos túbu-

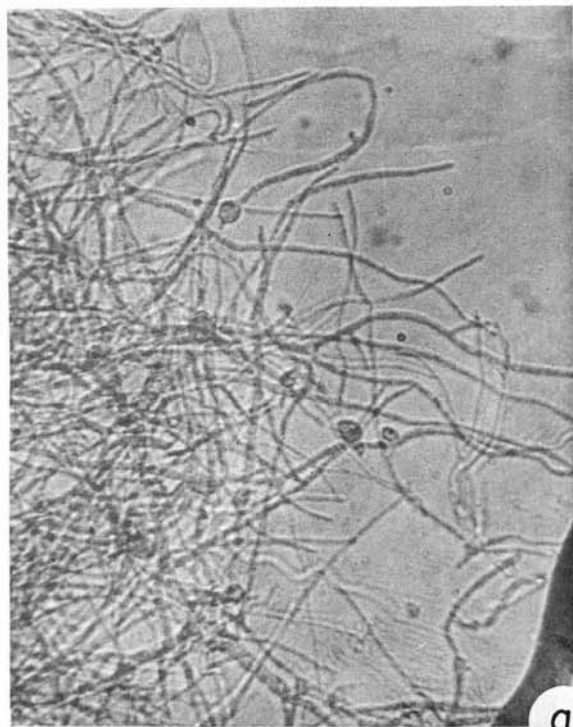


Fig. 2 - *Paracoccidioides brasiliensis* (amostra "pinguim"). Fase filamentosa. Exame microscópico em ágar batata, notando-se clamidosporos intercalares e terminais. a) 100X.

- los seminíferos. Em meio ao processo granulomatoso e no abscesso, perceberam-se formas do fungo arredondadas, por vezes com múltipla gemulação.
- e) a dosagem de proteínas revelou que os exoantígenos de 5, 10, 15, 20 e 30 dias obtidos da fase Y apresentavam concentrações de 12,4mg/ml; 12,4mg/ml; 9,1mg/ml; 7,6mg/ml e 7,6mg/ml, respectivamente. O exoantígeno obtido da fase M apresentou a concentração de 15,0mg/ml de proteínas, e o antígeno de *P. brasiliensis* de referência, concentração de 46mg/ml.
- f) a prova de IDD realizada com os exoantígenos obtidos de ambas as fases do fungo revelou banda de precipitação com identidade ao antígeno de *P. brasiliensis*, demonstrando-se, também, a presença do antígeno E₂. (Fig. 7)
- g) o perfil eletroforético do antígeno obtido da amostra 113 do *P. brasiliensis* (SDS-PAGE) demonstrou as frações de 72, 58, 43 e 18 kDa; os antígenos obtidos da amostra "pinguim" também demonstraram frações de

72, 58 e 43 kDa, porém com menor intensidade quando comparados ao antígeno de referência. Tais antígenos não apresentaram a fração de 18 kDa, mas frações de peso molecular acima de 94 kDa.

- h) pela imunoeletroforese, foi observada a formação de arco de precipitação de migração catódica (antígeno E₂) frente a soro de coelho anti-*P. brasiliensis* e "pool" de soros de pacientes portadores de paracoccidioidomicose. (Fig. 8).

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram, através de vários métodos, a identidade da amostra "pinguim", isolada no Uruguai por GEZUELE et al. (1989, 1992)^{8,9}, com a amostra de referência de *P. brasiliensis*. De acordo com KAUFMAN & STANDARD (1989)¹⁰, exoantígenos possuem grande valor para a imunoidentificação de fungos dimórficos, resolvendo de maneira precisa problemas de taxonomia fúngica. Muitos fungos produzem antígenos próprios, permitindo identificação específica. Conforme demonstrado pelo SDS-PAGE, as frações presentes nos antígenos obtidos da amostra "pinguim" corresponderam às mesmas encontradas no antígeno da amostra de referência, principalmente a fração de 43 kDa, de grande valor na imunoidentificação do *P. brasiliensis*. Através da imunoeletroforese foi verificada a presença de um arco de migração catódica, correspondente ao arco E₂.

Variações na micromorfologia da fase leveduriforme da amostra "pinguim" não justificam a criação da espécie *antarcticus*, como sugerem os eminentes colegas uruguaios.

Poder-se-ia tratar de uma nova variedade, mas não de nova espécie.

No que diz respeito às inoculações em cobaias, obtivemos orquite experimental com a fase miceliana do fungo, ao contrário do referido por GEZUELE et al. (dados em publicação)⁹.

Confirmamos os achados obtidos por CAMARGO et al. (1991, 1992)^{3,4}, e GARCIA et al. (1991, 1992)^{6,7} em comunicação anterior, considerando *P. antarcticus* sinônimo de *P. brasiliensis*.

O importante a considerar nestes estudos é o isolamento do *Paracoccidioides brasiliensis* das fezes de um pinguim, na Antártica uru-

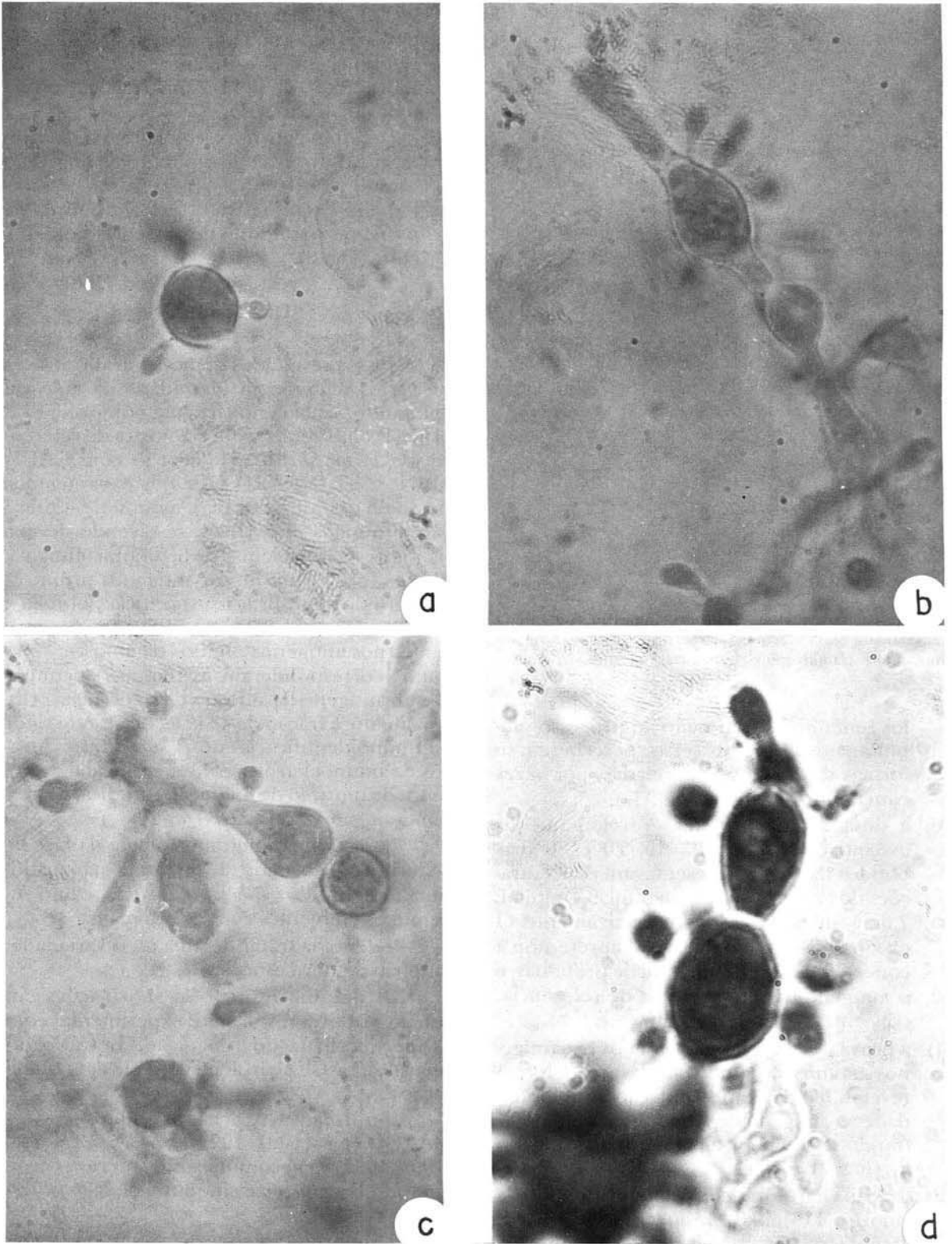


Fig. 3 - *Paracoccidioides brasiliensis* (amostra "pinguim"). Cultivo em ágar Sabouraud a 37°C. a), b) e c) 400X; d) 630X. Elementos arredondados, com gêmulas e algumas formas ovaladas.

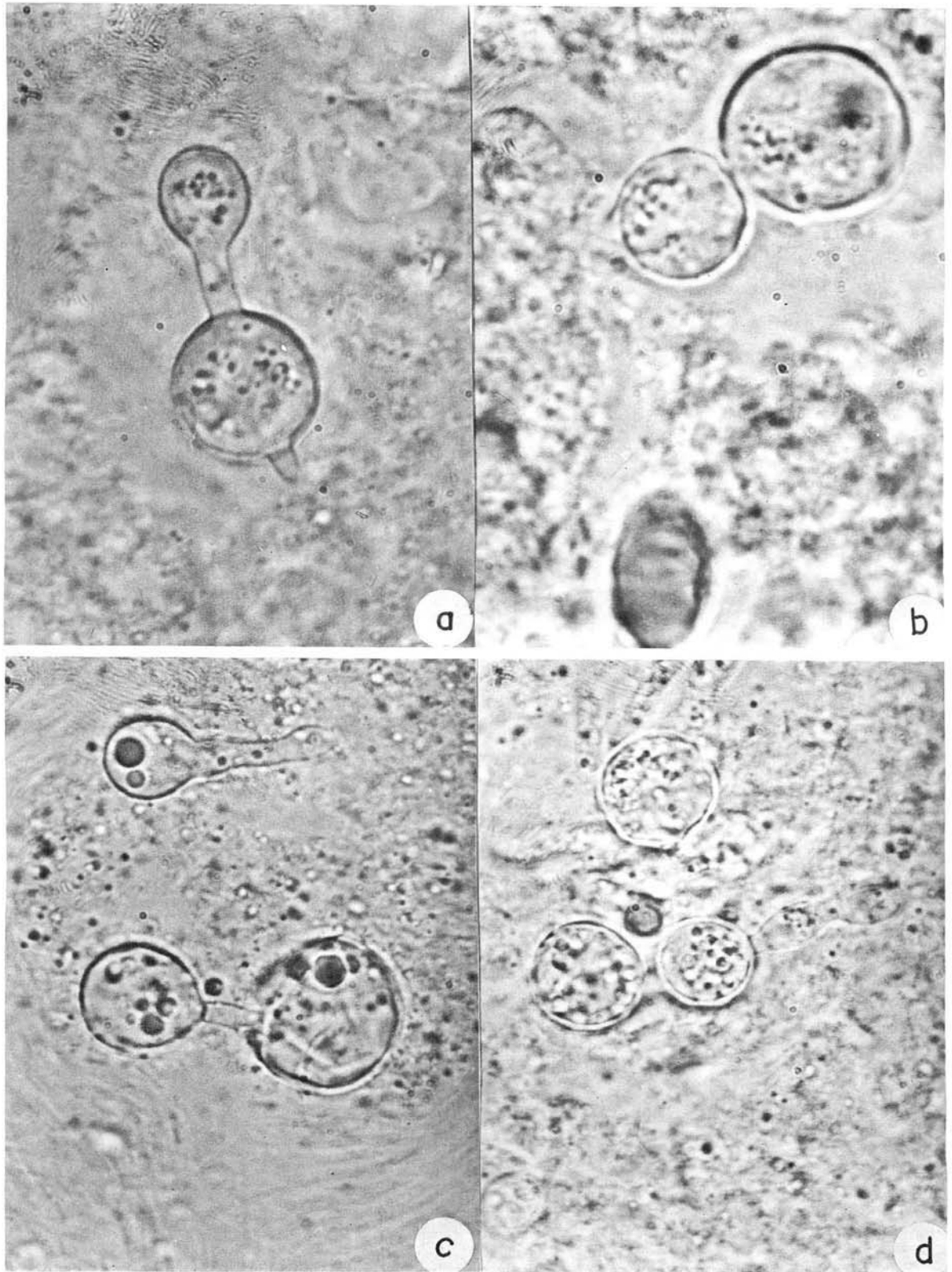


Fig. 4 - Aspectos microscópicos do *P. brasiliensis* (amostra "pinguim") em testículo de cobaio, inoculado com a forma miceliana. Tubos germinativos são frequentes, bem como formas em halteres. a) 500X; b) 630X; c) e d) 400X.

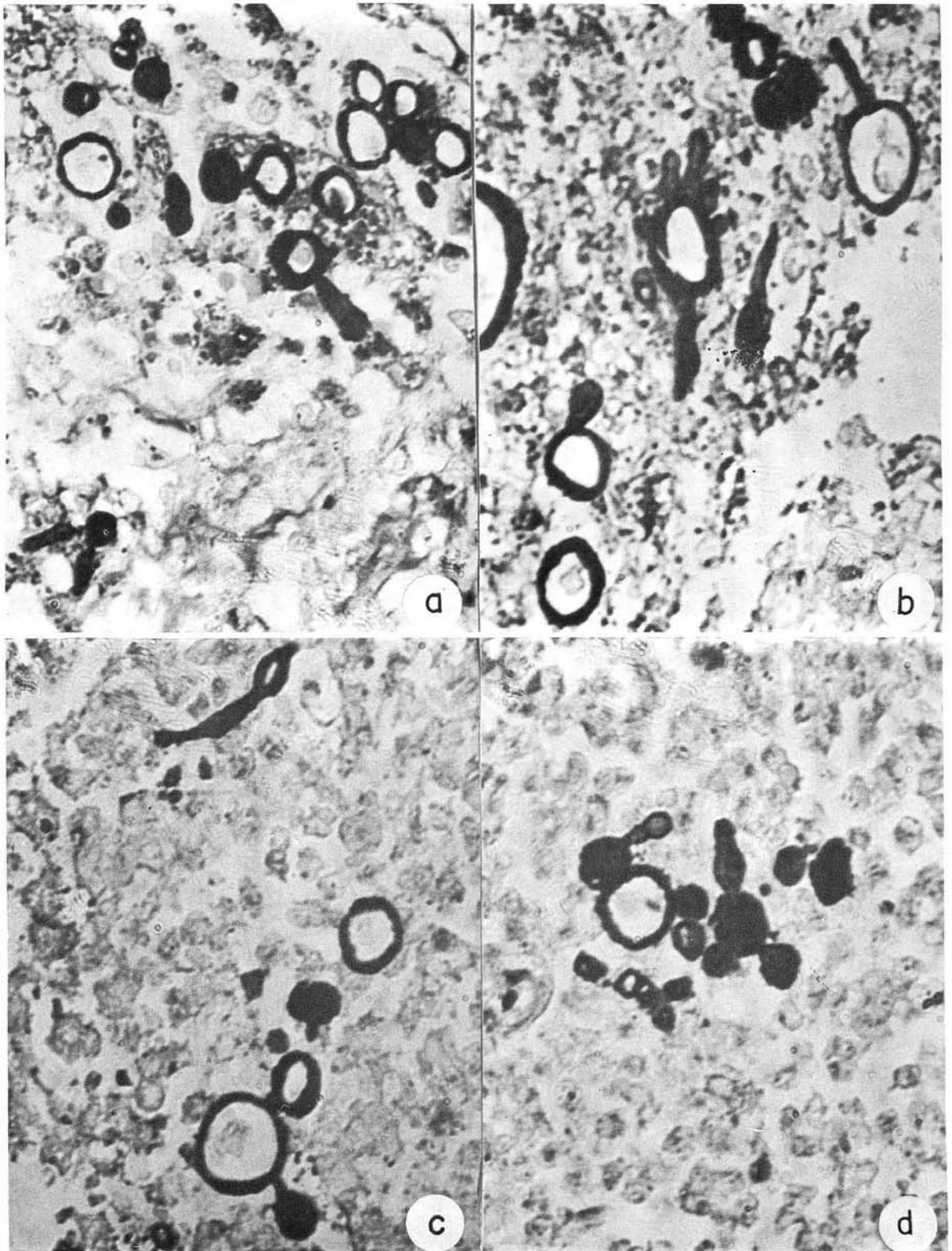


Fig. 5 - Novos aspectos micromorfológicos em testículo de cobaio. Amostra "pinguim". Notar tubos germinativos e blastoconídios em forma de "halteres". Destaca-se, a espessura da parede celular. Coloração: Gomori-Grocott. a) 200X, b), c) e d) 250X.

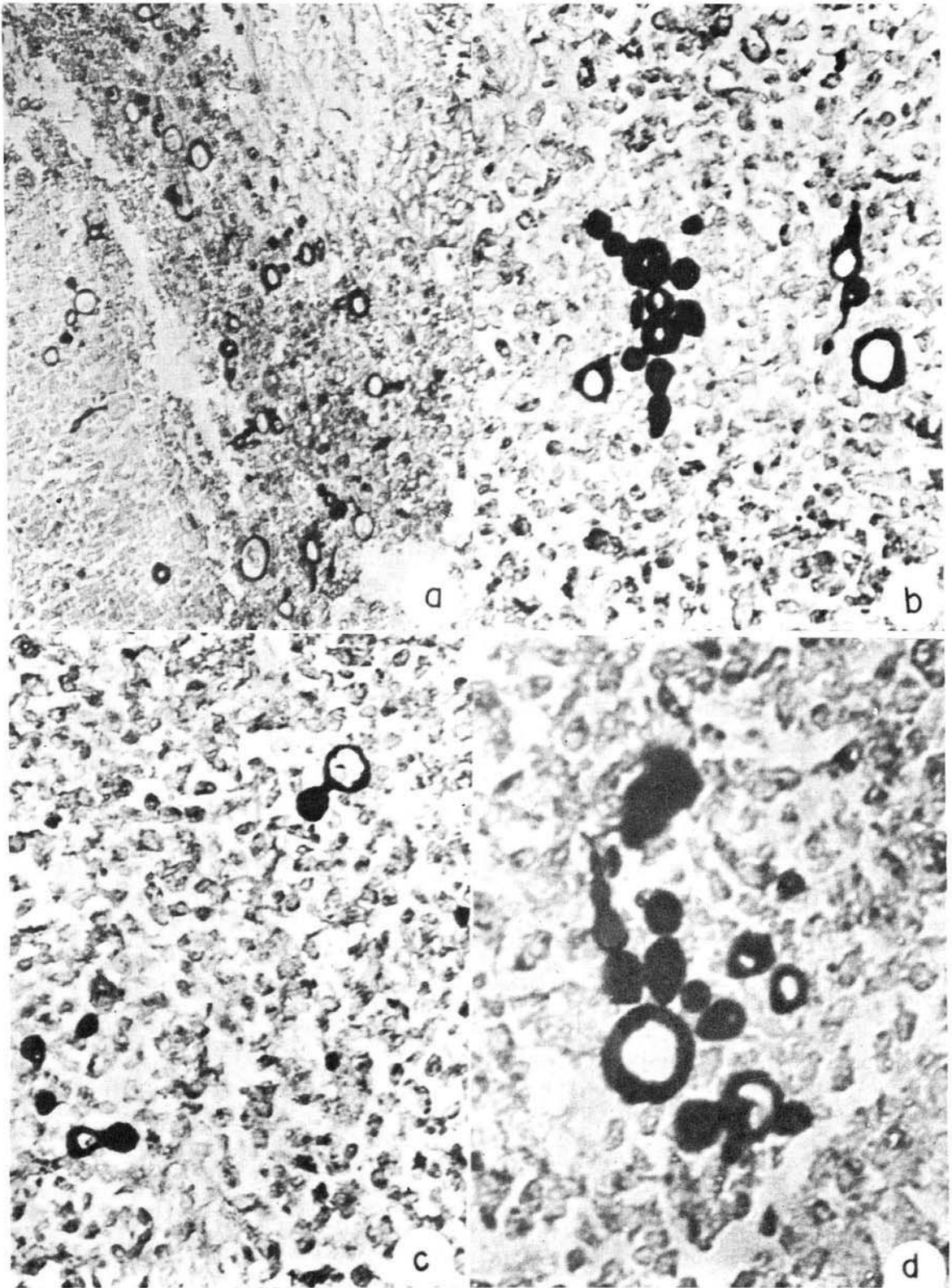


Fig. 6 - Aspectos micromorfológicos da amostra "pinguim" em testículo de cobaio. Nota-se a espessa parede celular, observando-se nítido brotamento e pseudo-micélio. Coloração pelo Gomori-Grocott. a) 100X; b) e c) 160X; d) 250X.

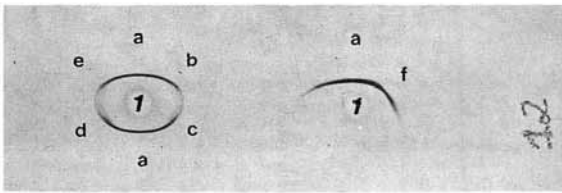


Fig. 7 - Exoantígenos da amostra IHM-1962 de *P. brasiliensis* produzidos em meio de neopeptona, glicose, tiamina e asparagina.

- a = antígeno de referência de *P. brasiliensis*
b = antígeno obtido da amostra "pinguim" a 37°C com 5 dias de crescimento
c = antígeno obtido da amostra "pinguim" a 37°C com 10 dias de crescimento
d = antígeno obtido da amostra "pinguim" a 37°C com 15 dias de crescimento
e = antígeno obtido da amostra "pinguim" a 37°C com 20 dias de crescimento
f = antígeno obtido da amostra "pinguim" a 25°C com 30 dias de crescimento
1 = anti-soro anti-E₂

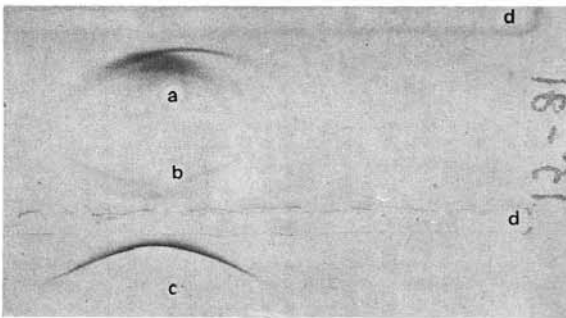


Fig. 8 - IMUNOELETROFORESE:

- a: antígeno da amostra 113 do *P. brasiliensis* (referência)
b: antígeno da amostra "pinguim" com 10 dias de crescimento a 37°C
c: antígeno da amostra "pinguim" com 30 dias de crescimento a 25°C
d: "pool" de soros de pacientes com paracoccidioidomicose

guaia, localizada na Ilha Rei George, não se podendo determinar com segurança, se a cloaca destes animais seria o eventual habitat do fungo. Do ponto de vista epidemiológico, este achado assume significativa importância.

Novos estudos, baseados na chamada taxonomia molecular, incluindo cariotipagem, poderão elucidar mais precisamente se a amostra "pinguim" corresponde a uma variedade do *P. brasiliensis*, uma vez que a identidade com esta espécie, através de métodos imunológicos, foi perfeitamente demonstrada.

SUMMARY

Paracoccidioides brasiliensis, a new strain isolated from a fecal matter of a penguin (*Pygoscelis adeliae*)

The Authors show the results obtained through the study of a *Paracoccidioides* strain isolated from a penguin in the Uruguayan Antarctic by GEZUELE et al. (1989). From the fecal matter it was isolated a fungus which was recently considered as a new species of the genus *Paracoccidioides* - *P. antarcticus*. However, the mycological and immunochemical studies including the demonstration of the 43 kDa glycoprotein by immunodiffusion test, SDS-PAGE and immunoelectrophoresis disclosed that such strain is similar to *P. brasiliensis*.

Other studies, based on molecular taxonomy, including karyotyping, are the only tools to confirm the possibility of such strain to be a variant of *P. brasiliensis*.

The Authors report the epidemiological significance of that finding and suggest a review in the knowledge of the ecological "niche" of *P. brasiliensis*.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Gildo Del Negro pela revisão do texto, à Creusa P. Siqueira pelo trabalho datilografado, à Maria José Soares Mendes-Giannini pelo fornecimento do soro de coelho anti-gp 43 kDa e ao Prof. Thales de Brito pela realização do exame histopatológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSIS, C.M. de - Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* solúveis em NaCl 0,85%. São Paulo, 1990. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
2. CALEGARI, L.; LOWINGER, M.; GEZUELE, E.; FUENTES, L.; ROSA, D. da & CONTI-DIAZ, I. - Comparación antigénica entre *P. antarcticus* y *P. brasiliensis*. In: CONGRESSO ARGENTINO DE MICOLOGIA, 4 e JORNADAS ARGENTINAS DE MICOLOGIA, 14, Huerta Grande, Córdoba, 1989. Anais. Córdoba, 1989. p.2.
3. CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; BLOTTA, M.H.S.L.; AGUILAR, M.A.P.G.; SARAIVA, E. & UNTERKIRCHER, C. - Relação antigénica entre o *P. brasiliensis* e *Paracoccidioides* sp isolado das fezes de pinguim. In: CONGRESSO BRA-

- SILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16, Santos, 1991. *Anais. p.76. Rev. Microbiol*, 22 (supl. 1):76, 1991.
4. CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.C. & UNTERKIRCHER, C. - *Paracoccidioides* sp isolado das fezes de pinguim da Antártica pertence a espécie *brasiliensis*? *Rev. argent. Micol.*, 15(1):32, 1992.
 5. DEL NEGRO, G.M.B.; MENDES GIANNINI, M.J.; GARCIA, N.M. & ASSIS, C.M. - Occurrence of 43 kDa glycoprotein (gp43) in different culture filtrates of *P. brasiliensis* (strain FMUSP 113). In: JORNADA CIENTÍFICA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO, 3, São Paulo, 1989. *Anais. p. 101. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 31 (supl.7): 101, 1989.
 6. GARCIA, N.M.; DEL NEGRO, G.M.B.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. & LACAZ, C.S. - *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada das fezes de um "pinguim" (*Pygoscelis adeliae*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 14, Santos, 1991. *Anais. p.69. Rev. Microbiol.*, 22 (supl. 1):69, 1991.
 7. GARCIA, N.M.; DEL NEGRO, G.M.B.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.; ASSIS, C.M. & LACAZ, C.S. - *Paracoccidioides brasiliensis*: a new strain isolated from a fecal matter of a penguin. *Rev. argent. Micol.*, 15(1):30, 1992.
 8. GEZUELE, E. - Aislamiento de *Paracoccidioides* sp de heces de pinguino de la Antartida. In: ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 4, Caracas, 1989. *Anais. p.B-2.*
 9. GEZUELE, E.; CALEGARI, L. & CONTI DIAZ, I.A. - Isolation of *Paracoccidioides antarcticus* nov sp. from a penguin droppings. (Trabalho enviado para apreciação e eventual publicação no *J. med. vet. Mycol.*, 1992. Cópia enviada pelo Dr. Flávio de Queiroz Teles Filho (Curitiba-PR).
 10. KAUFMAN, L. & STANDARD, P. - Fungal Exoantigens. In: DROUHET, E.; COLE, G.T.; REPENTIGNY, L. de; LATGÉ, J.P. & DUPONT, B., ed. *Fungal antigens - isolation, purification and detection*. Paris, Plenum Publishing Co., 1989. p.111-117.
 11. LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
 12. 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.
 13. OUCHTERLONY, O. - Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 6:30-154, 1962.
 14. SIQUEIRA, A.M. de - Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e o controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E₂ do *P. brasiliensis*. São Paulo, 1982. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

Recebido para publicação em 27/08/1992
Aceito para publicação em 27/01/1993