



Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Estratégias para o conhecimento da coccidioidomicose - uma doença
emergente no Nordeste brasileiro

Rossana de Aguiar Cordeiro

Fortaleza – Ceará
2006

Universidade Federal do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Estratégias para o conhecimento da coccidioidomicose - uma doença
emergente no Nordeste brasileiro**

Rossana de Aguiar Cordeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

Fortaleza – Ceará

2006

Aos meus pais e irmãs, dedico.

AGRADECIMENTOS

De modo especial, ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pela orientação justa, feita com críticas severas, incentivos aos solavancos e compreensão silenciosa nos momentos difíceis. Agradeço a confiança e tenho certeza de que, “se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes” (*Sir Isaac Newton*).

Ao Prof Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, exemplo de profissionalismo e disciplina, agradeço a amizade, paciência, bem como todas as suas críticas, que muito contribuíram para a minha formação profissional.

À Prof^ª. Dr^ª. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela amizade incondicional, competência e dedicação a todas as etapas deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, pela colaboração com os ensaios de reatividade antigênica.

Ao Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, pelas críticas e sugestões em várias etapas deste trabalho.

Aos Professores, Dr^ª. Vânia Maria Maciel Melo, Dr. Benildo Sousa Cavada e Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, por disponibilizarem alguns reagentes e equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Bodo Wanke, por haver aceitado participar da minha banca examinadora.

Ao Prof. João Vianney Campos de Mesquita, pela revisão estilística e gramatical deste trabalho.

Aos amigos José Olavo Moraes, Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues e José Everardo Araújo de Sousa, pela ajuda técnica em muitas etapas deste trabalho.

À Marta Maria de Vasconcelos e Ivone Souza, secretárias dos cursos de Mestrado em Microbiologia Médica e Doutorado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, respectivamente, pela atenção e disponibilidade.

Aos professores e colegas do curso de Doutorado em Ciências Médicas, pelo convívio agradável.

A todos os que fazem parte da família do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, pela amizade.

RESUMO

A coccidioidomicose é uma infecção sistêmica causada pelos fungos dimórficos *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*. A doença acomete o homem e uma grande variedade de animais, sendo endêmica no Estado do Ceará, onde é causada pela espécie *C. posadasii*. O presente estudo buscou analisar as características fenotípicas de *C. posadasii* e desenvolver métodos independentes de cultivo para o diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose. O estudo fenotípico de 10 cepas (7 isolados clínicos e 3 isolados ambientais) foi conduzido por análises macro e micromorfológica, análise da cinética de crescimento frente a estresse salino, térmico e de pH; testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e determinação do perfil de sensibilidade frente a antimicrobianos. Adicionalmente, foram avaliados métodos de extração de antígenos de cepas locais de *C. posadasii* e amplificação de seqüências genéticas exclusivas do fungo em escarro. Foram observadas três variações morfológicas das cepas de *C. posadasii* cultivadas em ágar batata, ágar Sabouraud dextrose a 2% e ágar YEG. Com relação a micromorfologia, foi detectado que a quantificação de artroconídios estava relacionada à idade e a morfologia das colônias. A avaliação da cinética de crescimento das cepas, *in vitro*, revelou que as cepas de *C. posadasii* são inibidas por elevada concentração salina e temperaturas acima de 40 °C, mas não sofrem influência quanto à variação de pH do meio. A análise nutricional demonstrou que vários compostos, inclusive os íons oxidados nitrito e nitrato, podem ser utilizados como fontes de carbono e/ou nitrogênio. Todas as cepas de *C. posadasii* foram sensíveis às drogas antifúngicas anfotericina B, caspofungina e aos derivados azólicos cetonazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol. Foi observado que, a exceção da pirazinamida, todos as demais drogas antituberculose alteraram o crescimento das cepas de *C. posadasii in vitro*. Combinações formadas pelos quimioterápicos antituberculose também mostraram efeito inibitório sobre o crescimento das cepas. Os protocolos experimentais culminaram com uma preparação antigênica estável e imunoreativa, adequada para utilização em testes sorológicos presuntivos para diagnóstico da coccidioidomicose. A identificação molecular de *C. posadasii* foi realizada, com sucesso, a partir da amplificação da seqüência do gene *pra* diretamente de culturas filamentosas e escarro contendo estruturas parasitárias do fungo. Acredita-se que as características fenotípicas descritas para as cepas de *C. posadasii* poderão auxiliar estudos futuros que objetivem a individualização biológica das espécies *C. immitis* e *C. posadasii*. Os resultados desse estudo contribuíram para o estabelecimento de estratégias para o maior conhecimento da coccidioidomicose no Brasil.

ABSTRACT

Coccidioidomycosis is a systemic infection caused by the dimorphic fungi species *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*. The disease affects both humans and animals, and is considered endemic in the semiarid areas of Ceará State (Northeast Brazil), where it is caused by *C. posadasii*. The aims of this study were to analyse the phenotypical characteristics of *C. posadasii* and to develop culture independent methods for improving of the laboratorial diagnosis of coccidioidomycosis. The phenotypical study was conducted with 10 strains (7 from clinical and 3 from ambiental sources) by macro and micromorphology analyses; *in vitro* growth under different conditions of salinity, temperature and pH; nutritional analysis and antimicrobial susceptibility tests. In addition, methods of antigens extraction and amplification of *C. posadasii* DNA directly in sputum were also tested. The mycological analysis showed three morphological variations of *C. posadasii* strains cultivated in potato agar, Sabouraud agar and YEG agar. Regarding to micromorphology, it was observed that arthroconidia counts were related to colony aging and texture. Growth rates of *C. posadasii* strains were inhibited by high salt concentrations, temperatures above 40 °C, but were not affected by the range of pH. Nutritional analyses showed that several compounds, including the oxidized ions, nitrite and nitrate, were efficiently metabolized by *C. posadasii* strains as carbon and/ or nitrogen sources. The antifungal susceptibility analysis showed that all of the strains of *C. posadasii* were sensitive to amphotericin B, caspofungin and the azoles ketoconazole, itraconazole, fluconazole, and voriconazole. With the exception of pyrazinamide, all of the tested drugs interfered with the *in vitro* growth of *C. posadasii*. Combined antituberculosis drugs also inhibit fungal growth *in vitro*. Experimental protocols produced a stable and immunoreactive antigen, suitable in presumptive serologic tests for the diagnosis of coccidioidomycosis. Molecular identification of *C. posadasii* was achieved by PCR amplification of the specific *pra* gene directly from filamentous cultures and sputum with fungal parasitic structures. The data obtained by phenotypical analyses may be useful in future studies for biological distinction of *C. immitis* and *C. posadasii* species. The results of this study provided approaches for a better understanding of coccidioidomycosis in Brazil.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 REVISÃO DE LITERATURA	01
1.1 Aspectos históricos da coccidioidomicose	01
1.2 <i>Coccidioides</i> spp.: características gerais	04
1.2.1 Ecologia	07
1.2.2 A análise genética no entendimento da biologia de <i>Coccidioides</i> spp.	09
1.3 Aspectos epidemiológicos da coccidioidomicose	11
1.4 Patogenia e formas clínicas	16
1.5 Perfil de sensibilidade de <i>Coccidioides</i> spp. frente às drogas antifúngicas	18
1.6 Diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose	21
1.6.1 Diagnóstico micológico	21
1.6.2 Diagnóstico imunológico	23
1.6.2 Diagnóstico molecular	25
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos gerais	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 Seleção das amostras e etapas da pesquisa	31
4.2 Etapa I - Caracterização fenotípica	33
4.2.1 Caracterização macro e micromorfológica das cepas de <i>C. posadasii</i>	34
4.2.2 Avaliação da cinética de crescimento	34
4.2.3 Testes fisiológicos	35
4.2.4 Teste de sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i>	37
4.3 Etapa II - Produção de antígenos e testes de reatividade <i>in vitro</i>	40
4.3.1 Produção de antígenos	40
4.3.2 Determinação da concentração de proteínas	42
4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)	43
4.3.4 Imunodifusão radial dupla (Ouchterlony)	45
4.3.5 Reatividade das preparações antigênicas ante amostras de soro humano	45
4.4 Etapa III - Diagnóstico molecular	46
4.4.1 Extração de DNA de culturas de <i>C. posadasii</i>	46

4.4.2. Extração do DNA de <i>C. posadasii</i> em amostra de escarro	47
4.4.3. Quantificação de DNA	49
4.4.4 Ensaio de <i>nested</i> PCR	49
4.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	50
5 RESULTADOS	51
5.1. Etapa I - Caracterização fenotípica	51
5.1.1 Caracterização macro e micromorfológica	51
5.1.2 Avaliação da cinética de crescimento <i>in vitro</i>	55
5.1.3 Testes fisiológicos	57
5.1.4 Testes de sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i>	60
5.2 Etapa II - Produção de antígenos e testes de reatividade <i>in vitro</i>	65
5.2.1 Produção de antígenos	65
5.2.2 Perfil eletroforético das preparações antigênicas em SDS-PAGE	65
5.2.3 Avaliação da reatividade antigênica através de Imunodifusão	66
5.3 Etapa III - Diagnóstico molecular	68
5.3.1 – Extração de DNA	68
5.3.2 Ensaio de <i>nested</i> PCR	69
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO I. Meios de culturas e soluções utilizadas na tese	99
ANEXO II. Mapa de ocorrência da coccidioomicose e tuberculose no Estado do Ceará	108
ANEXO III. Publicações	110

LISTA DE FIGURAS

1	Distribuição geográfica de <i>Coccidioides</i> spp.	05
2	Ciclo biológico de <i>Coccidioides</i> spp., mostrando alternância as fases saprotítica no ambiente e parasitária em hospedeiro suscetível.	06
3	Representação diagramática da alternância entre as fases saprofítica e parasitária de <i>C. posadasii</i> <i>in vitro</i> .	07
4	Dispersão de cepas de <i>C. immitis</i> californianas (CA) e não-californianas (não-CA) no continente americano.	11
5	Distribuição espacial dos casos humanos autóctones de coccidiodomicose no Brasil.	12
6	Distribuição atual dos casos de coccidiodomicose no Estado do Ceará.	13
7	Diagnóstico micológico de <i>Coccidioides</i> spp.	22
8	Esquema representativo da organização do “cluster” de genes do rDNA, no sentido 5’-3’.	26
9	Esquema de reação de amplificação do gene <i>pra</i> , específico para <i>C. posadasii</i> .	27
10	Esquema de extração de DNA de <i>Coccidioides</i> spp., a partir de amostra de sangue ou biópsia, através de kits comercializados pela empresa <i>Quiagen</i> .	28
11	Exame direto, em KOH a 30%, de escarro impróprio para cultura, apresentando esférula sugestiva de <i>C. posadasii</i> e numerosas células epiteliais.	48
12	Análise macromorfológica de cepas de <i>C. posadasii</i> .	52
13	Artroconídios de <i>C. posadasii</i> , mensurados por meio de retículo micrométrico acoplado a ocular de 10X.	55

14 Curvas ajustadas do crescimento médio das cepas de <i>C. posadasii</i> em ágar YEG suplementado com 2, 4, 6 ou 8% de NaCl.	56
15 Curvas ajustadas do crescimento médio das cepas de <i>C. posadasii</i> em ágar YEG a 20, 30 ou 40 °C.	56
16 Curvas ajustadas do crescimento médio das cepas de <i>C. posadasii</i> em ágar YEG ajustado aos valores de pH 4, 6, 8, 10, 11.	57
17 Perfil de assimilação de <i>C. posadasii</i> .	60
18 Visualização do teste de produção da enzima urease por <i>C. posadasii</i> .	60
19 Leitura do ensaio de macrodiluição	63
20 Perfil de sensibilidade, <i>in vitro</i> , de cepas de <i>C. posadasii</i> frente a drogas antituberculose combinadas.	64
21 SDS-PAGE das preparações antigênicas, em poliacrilamida a 12,5%, obtidas com a cepa CEMM 01-6-085.	66
22 Teste de imunodifusão radial dupla em ágar, obtida com antígenos extraídos da cepa CEMM 01-06-085.	67
23 Perfil eletroforético das amostras de DNA total obtidas de culturas de <i>C. posadasii</i> .	71
24 Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida de fragmento do gene Ag2/PRA obtido em reação de <i>nested</i> PCR.	71

LISTA DE QUADROS

1 Principais características dos casos autóctones de coccidioidomicose no Brasil registrados em literatura.	15
2 Relação das cepas de <i>C. posadasii</i> utilizadas na pesquisa	32
3 Relação das amostras de soro utilizadas na pesquisa, origem geográfica e quantidade de cada amostra	33
4 Relação dos compostos testados nos testes de assimilação em meio mineral.	37
5 Drogas antifúngicas e concentrações testadas na pesquisa.	39
6 Concentrações de cada quimioterápico testado isoladamente ou em combinações	39
7 Resumo das principais etapas empregadas durante o preparo das frações antigênicas	44

LISTA DE TABELAS

- 1 Análise macromorfológica de cepas de *C. posadasii* após 5 e 20 dias de cultivo a 28 °C em ágar batata, ágar Sabouraud e ágar YEG. 53
- 2 Análise micromorfológica de *C. posadasii* após 5 e 20 dias a 28 °C em ágar batata, ágar Sabouraud e ágar YEG. 54
- 3 Perfil de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio por cepas de *C. posadasii* 59
- 4 Perfil de sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *C. posadasii* frente a antifúngicos. 62
- 5 Perfil de sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *C. posadasii* frente a drogas anti-tuberculose 63
- 6 Rendimento protéico (mg/mL) das preparações antigênicas obtidas com a cepa CEMM 01-6-085, após 30 dias de cultivo. 65
- 7 Reatividade das preparações antigênicas de *C. posadasii* e do antígeno controle de *C. immitis* (Immy) frente a amostras de soro de pacientes com coccidioidomicose e indivíduos normais, residentes de zonas endêmicas da doença. 68
- 8 Grau de pureza e concentração das amostras de DNA de cepas de *C. posadasii*, a partir de culturas mantidas em meio líquido (Protocolo I: CTAB; Protocolo II: Triton-TE) ou meio sólido (Protocolo III: Triton-TE). 70

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> – Meio de cultura contendo infusão de cérebro e coração bovinos
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNTP	desoxinucleotídeo fosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ETS	Externally Transcribed Spacer
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
kDa	Unidade de massa atômica que equivale aproximadamente à massa de um átomo de hidrogênio; unidade usada para expressar peso molecular
Mb	Mega pares de bases de nucleotídeos, Mb= 10^6 pares de bases
MOPS	Ácido 2- [N-morfolino] propanossulfônico
NTS	<i>Non-transcribed Spacers</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> - Eletroforese em campo pulsátil
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no instituto Roswell Park Memorial
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis – sodium dodecil sulphate Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
sp.	Espécie determinada; representa formas que foram sujeitas a uma classificação ao nível da espécie, mas que por várias razões não foi possível atribuí-las a nenhuma das espécies conhecidas
spp.	Espécies indeterminadas; o conjunto de formas em estudo comporta representantes de várias espécies que, por qualquer razão não se considerou necessário explicitá-las
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	TEMED; N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane
UFC/mL	Unidade formadoras de colônias por mililitro
YEG	Meio de cultura contendo extrato de levedura e glicose

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aspectos históricos da coccidioidomicose

O primeiro caso de coccidioidomicose foi descrito em um paciente de 33 anos, Domingo Ecurra, soldado de cavalaria no noroeste da Argentina. Em 1889, ele buscou ajuda médica após notar uma lesão na face, inicialmente relacionada à picada de inseto, a qual evoluiu para um nódulo verrucoso, com o concomitante aparecimento de outras lesões nas virilhas e dorso (ODDS, 2003).

De acordo com registros históricos da doença, àquela época, Domingo Ecurra havia realizado tratamento experimental, deliberadamente, com folhas de tabaco e tentado a excisão das lesões com sua própria faca de corte. Sob cuidados médicos, o paciente foi tratado com ácido nítrico, compostos de mercúrio e iodeto de potássio, mas, infelizmente, não conseguiu remissão das lesões. Ecurra foi então encaminhado a um jovem médico, Alejandro Posadas, o qual, ao examinar biopsias das lesões ao microscópio, observou estruturas semelhantes à de protozoários (POSADAS, 1892 apud WANKE et al., 1999). Por acreditar que estava diante de nova espécie de parasita, nomeou o microrganismo de *Psorospermia* e as estruturas observadas foram denominadas esporângios. Alejandro Posadas dedicou o seu trabalho de doutoramento à descrição completa do caso e necropsia do paciente, o qual faleceu em 1898, em decorrência de complicações da forma disseminada da coccidioidomicose (ODDS, 2003).

O segundo caso conhecido da doença foi diagnosticado em Joas Furtado-Silveira, fazendeiro original dos Açores, mas que havia emigrado para o Vale do San Joaquin, na Califórnia (ODDS, 2003), região atualmente conhecida como a mais importante área endêmica da doença no mundo (GALGIANI et al., 2005). Por volta de 1886, o paciente apresentou extensas lesões cutâneas na face, sendo então encaminhado para estudos com os médicos Emmett Rixford e Thomas Caspar Gilchrist (RIXFORD, 1894 apud WANKE et al., 1999). Após o exame de biopsias das lesões, os médicos reconheceram a semelhança dos achados com aqueles previamente descritos por Posadas, mas resolveram nomear o microrganismo como *Coccidioides immitis*, uma vez que suas estruturas *in vivo* eram análogas a parasitas do gênero *Coccidia* (RIXFORD, 1894 apud WANKE et al., 1999). Segundo Rixford e Gilchrist, o patógeno envolvido era, de fato, um protozoário, tendo acreditado que o

micélio fúngico que aparecia em cultivos artificiais era um contaminante anemófilo (RIXFORD, 1894 apud COX & MAGEE, 2004).

Segundo Odds (2003), em virtude da falha no diagnóstico e das limitações terapêuticas da época, Silveira foi submetido a vários tratamentos impróprios, tais como uso intralesional de violeta de genciana, iodo e brometo, pomadas contendo mercúrio, fenol e iodeto de potássio, além de constantes escarificações, cortes e cauterizações das lesões. Em consequência da evolução da doença, bem como dos numerosos procedimentos inadequados aos quais foi submetido, o paciente, quando da sua morte, apresentava lesões disseminadas graves, além de cegueira, mutilação do nariz e das orelhas (ODDS, 2003). A evolução clínica do paciente, bem como de outro imigrante dos Açores acometido com a doença foi apresentada por Rixford e Gilchrist em 1896 (RIXFORD, 1894 apud COX & MAGEE, 2004). Em razão das diferenças na forma tecidual, no entanto, o agente etiológico foi denominado *C. pyogenes* (WANKE et al., 1999; COX & MAGEE, 2004).

A etiologia da coccidioidomicose foi revelada quatro anos depois, em 1900, pelos médicos William Ophüls e Herbert C. Moffitt, quando esses observaram a formação de micélio fúngico em culturas de tecido de um paciente com a doença (OPHÜLS, 1905 apud WANKE et al., 1999). Os autores inocularam uma suspensão do micélio em coelhos e, após sacrifício dos animais, evidenciaram nódulos semelhantes a tubérculos nos pulmões, baço e rins (OPHÜLS, 1905 apud WANKE et al., 1999). Observações em microscópio revelaram a presença das estruturas parasitárias já conhecidas e ausência de micélio fúngico (OPHÜLS, 1905 apud COX & MAGEE, 2004). Em 1905, Ophüls descreveu detalhadamente a natureza dimórfica do fungo *C. immitis*, a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo* (WANKE et al., 1999).

Até 1929, a coccidioidomicose era conhecida apenas em sua forma disseminada, a qual era denominada “granuloma coccidióidico”. Um acidente de laboratório naquela época, entretanto, sugeriu a existência de formas mais brandas da doença (DICKSON, 1937 apud COX & MAGEE, 2004). Harold Chope, um estudante de Medicina que realizava pesquisas sobre *Coccidioides* spp. no laboratório do professor Ernest Dickinson, abriu acidentalmente uma placa de Petri contendo o fungo em sua forma filamentosa. Após 9 dias, Chope apresentou quadro de pneumonia com dor pleurítica, febre, tosse, hemoptise e acentuada perda de peso. Depois de um mês de evolução da doença, o estudante apresentou nódulos

eritematosos nos membros inferiores e o diagnóstico de granuloma coccidióidico foi estabelecido após visualização de esférulas em amostras de escarro. Apesar do prognóstico grave, Chope apresentou melhora clínica e completa remissão dos sinais e sintomas da doença. Em 1937, Dickson apresentou, além do caso de Chope, quatro outros casos da forma benigna da doença, caracterizada por sintomas pulmonares agudos e eritema nodoso. O quadro apresentado por Chope foi denominado *Valley Fever* e o termo “coccidioidomicose” foi então proposto por Dickson para todas as formas infecciosas causadas por *Coccidioides* spp. (COX & MAGEE, 2004).

Observações posteriores confirmaram que a coccidioidomicose poderia cursar com uma forma pulmonar benigna, sendo esta bastante freqüente na região do Vale de San Joaquim (DRUTZ & CATANZARO, 1978). Por volta de 1940, a força aérea norte-americana estabeleceu, naquela região, campos de treinamento militar para a Segunda Guerra Mundial. Nesta época, o risco de contaminação ambiental por *Coccidioides immitis* foi intensamente estudado pelo médico epidemiologista Charles E. Smith, o qual, anos mais tarde, estabeleceu os primeiros testes de reatividade cutânea ao antígeno coccidioidina (DRUTZ & CATANZARO, 1978, 1978).

Os primeiros estudos sobre a coccidioidomicose no Brasil foram publicados por Versiani (1946) e Lacaz (1948), que realizaram testes intradérmicos com coccidioidina em pacientes com paracoccidioidomicose, demonstrando ausência de reações cruzadas entre essas duas infecções. Em seguida, Lacaz et al. (1960) analisaram a reatividade à coccidioidina em 750 pacientes que procediam de várias regiões do País e que estavam internados no Hospital das Clínicas e na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Os autores referiram positividade em apenas um caso, com incidência de 0,13%.

A coccidioidomicose-infecção também foi pesquisada por Fonseca et al. (1973), na região Norte do Brasil. Os autores não encontraram reatividade cutânea a esse antígeno fúngico em 500 indivíduos avaliados e concluíram que a região Amazônica era área indene para a coccidioidomicose. Posteriormente, Lacaz et al (1978) realizaram inquérito imunológico com esferulina em 393 pacientes internados em um hospital geral de São Paulo, tendo sido observada apenas uma reação positiva, em paciente oriundo do Estado da Bahia, o qual também mostrou positividade à paracoccidioidina e esporotriquina. Diante de tais fatos, os autores concluíram a inexistência da coccidioidomicose-infecção na região Sudeste do Brasil.

O primeiro caso de coccidiodomicose-doença no Brasil, porém, foi descrito por Gomes et al.(1978), em paciente natural de Pirapiranga, região do semi-árido do Estado da Bahia. Um ano depois, Vianna et al. (1979) descreveram o segundo caso autóctone da doença em paciente originário da cidade de Floriano, no Estado do Piauí.

Ainda que os primeiros casos autóctones de coccidiodomicose tenham sido descritos no final da década de 1970, a doença só foi novamente relatada aproximadamente 18 anos depois, por Kuhl et al. (1996), em caso ocorrido em 1989, acometendo paciente provindo do município de Jaguaribara, no Estado do Ceará. A fim de investigar a existência de coccidiodomicose-infecção naquele município, Diógenes et al. (1995) realizaram inquérito epidemiológico com esferulina em 87 moradores da localidade de Poço Comprido (Jaguaribara, Ceará). O estudo demonstrou índice de reatividade ao antígeno de aproximadamente 12%, sugerindo, assim, a existência de coccidiodomicose-infecção no Estado do Ceará.

O primeiro surto epidêmico de coccidiodomicose ocorreu em 1991, no município de Oeiras, Estado do Piauí, onde três indivíduos e oito cães apresentaram quadro respiratório agudo após participarem de uma caçada a tatus (WANKE, 1994). Sidrim et al. (1997) e Silva et al. (1997) relataram o segundo surto epidêmico de coccidiodomicose no Brasil, ocorrido em 1995, no Município de Aiuaba, região sudoeste do Estado do Ceará, onde quatro homens e dois cães apresentaram a forma pulmonar da doença após caça a tatus. A partir dessa época, diversos autores têm relatado, de forma cada vez mais freqüente, outros casos da doença no Nordeste brasileiro (MARTINS et al., 1997; MORAES et al., 1998; SILVA et al., 1999; VERAS et al., 2002; PAIXÃO et al., 2004; FECHINE, 2005).

1.2 *Coccidioides* spp.: características gerais

A coccidiodomicose é causada pelos fungos dimórficos *C. immitis* e *C. posadasii*. Apesar de serem morfológicamente indistinguíveis, estas espécies apresentam distribuição biogeográfica característica: *C. immitis* está limitado ao Vale de San Joaquin, na Califórnia, Estados Unidos, e *C. posadasii* possui ocorrência mais ampla, sendo encontrado nos Estados Unidos, México e América do Sul (FISHER et al., 2001, 2002), conforme demonstrado na figura 1.



Figura 1. Distribuição geográfica de *Coccidioides* spp. As áreas demarcadas em vermelho correspondem às zonas endêmicas da coccidioidomicose. A seta indica a região de ocorrência de *C. immitis*, limitada ao Vale de San Joaquin, no sudoeste dos Estados Unidos. *C. posadasii* pode ser encontrado ao longo das Américas, em todas as áreas mostradas em vermelho.

De acordo com Fisher et al (2002), o gênero *Coccidioides* possui a seguinte classificação taxonômica: reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae.

Durante a fase filamentosa do ciclo biológico, *Coccidioides* spp. formam hifas hialinas que originam artroconídios intercalados por células desprovidas de material citoplasmático, denominadas disjuntores (DE HOOG et al., 2001). Os artroconídios são facilmente destacáveis do micélio vegetativo e apresentam em suas extremidades restos de parede celular dos disjuntores, os quais facilitam a sua dispersão aérea (COLE, 1986). Ao serem inalados por um hospedeiro suscetível, os artroconídios sofrem mudanças morfológicas, evoluindo para esférulas que, ao atingirem a maturidade celular, liberam mais de 800 endósporos (BIALEK et al., 2004). Cada endósporo inicia o desenvolvimento de uma nova esférula, resultando, desta forma, em uma reprodução exponencial. Ao atingirem o solo,

na presença de condições adequadas, os endósporos crescem na forma filamentosa, garantindo, assim, a continuidade do ciclo biológico do microrganismo, conforme demonstrado na figura 2.

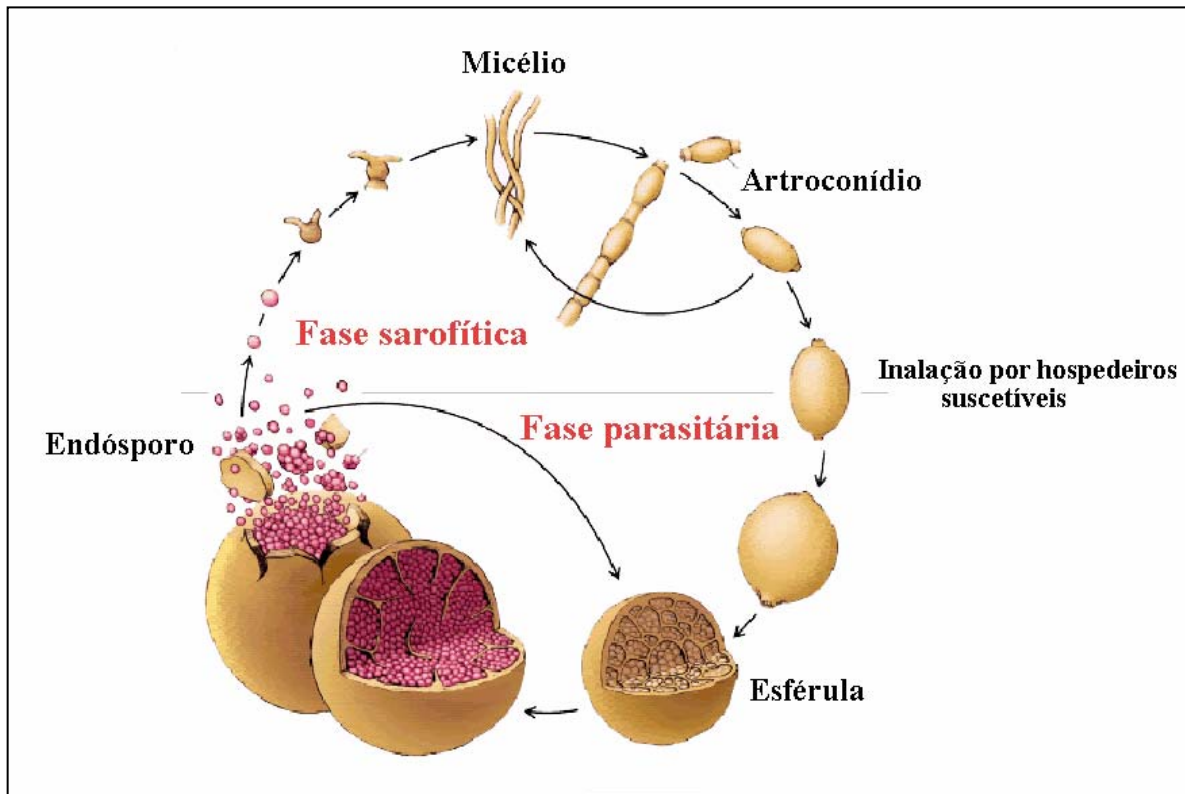


Figura 2. Ciclo biológico de *Coccidioides* spp., mostrando as fases saporfítica no ambiente e parasitária em hospedeiro suscetível. Figura modificada de Vaz et al., 1998.

Diversas pesquisas têm avaliado a dinâmica da formação das esférulas de *Coccidioides* spp., bem como o seu perfil de expressão temporal de proteínas antigênicas *in vitro* (COLE et al., 2002; HUNG et al., 2002; DELGADO et al., 2003). Segundo Delgado et al. (2003), o crescimento da forma parasitária de *C. posadasii*, *in vitro*, demonstra um padrão formado por duas etapas características: fase inicial com esférulas apresentando crescimento isotrópico e fase posterior, na qual aproximadamente há 80% das esférulas maduras, liberando os endósporos de seu interior (Figura 3). Observações *in vivo* mostram que a formação de esférulas pode demorar até 72 horas após a inalação de artroconídios (CHILLER et al., 2003).

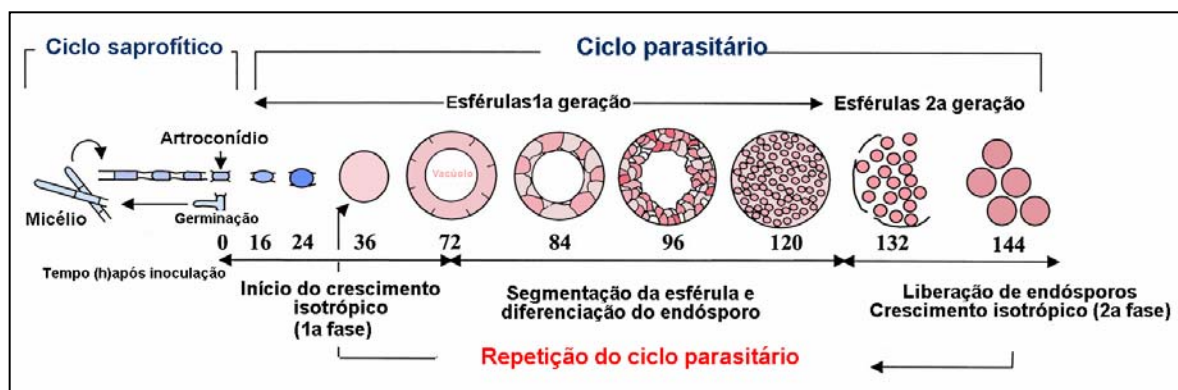


Figura 3. Representação diagramática da alternância entre as fases saprofítica e parasitária de *C. posadasii* *in vitro*. Figura modificada de Delgado et al. (2003).

1.2.1 Ecologia

Diversos fatores bióticos e abióticos, ainda desconhecidos em sua totalidade, influenciam a distribuição descontínua de *Coccidioides* spp. na natureza (COMRIE, 2005). Desde os primeiros registros de seu isolamento em ambiente natural por Stewart e Mayer em 1932 (GREENE et al., 2000), várias teorias foram aventadas com o intuito de explicar por que, apesar de fisiologicamente versáteis, esses organismos são encontrados apenas em sítios delimitados em uma dada zona endêmica. Sabe-se que, dentre as características físico-químicas do solo, a elevada alcalinidade (LACY & SWATEK, 1974) e a alta salinidade do solo (ELCONIN et al., 1964) são capazes de selecionar o crescimento de *Coccidioides* spp. na natureza.

A tolerância de *Coccidioides* spp. ante variações de temperatura no meio ambiente foi pesquisada por vários autores (PLUNKETT & SWATEK; 1957; KOLIVRAS et al., 2001). Em estudo realizado por Maddy (1965), *C. immitis* foi isolado de amostras de solo de até 12 mm de profundidade, com temperaturas entre 60 °C e 70 °C. Segundo Lacy e Swatek (1974), o fungo prefere as camadas subjacentes à superfície do solo, onde é possível evitar a ressecação causada pelas temperaturas elevadas e umidade reduzida.

O crescimento de *Coccidioides* spp. na natureza também é influenciado pela precipitação. Segundo Kolivras et al. (2001), durante períodos de intensa umidade no ambiente, os competidores presentes no solo crescem abundantemente, sobrepujando o crescimento de *C. immitis*. Após o período chuvoso, o *C. immitis* cresce rapidamente e,

durante a estiagem, o fungo consegue resistir à dessecação e à alta concentração de sais resultante da evaporação do solo. Distúrbios físicos, tais como ventanias, causam a quebra das hifas do fungo, com a concomitante dispersão dos artroconídios infectantes no ambiente (KOLIVRAS et al., 2001).

O estudo da correlação entre a distribuição natural do fungo e macroflora local tem demonstrado resultados irreprodutíveis. Segundo Lacy e Swatek (1974), *Coccidioides* spp. tem sido isolado de sítios naturais desprovidos dos vegetais originalmente considerados indicadores biológicos da presença do fungo, tais como o arbusto *Larrea tridentata* e cactáceas do gênero *Opuntia* (Kolivras et al., 2001).

De acordo com Lacy e Swatek (1974), pequenos mamíferos têm papel importante na dispersão de *Coccidioides* spp no meio ambiente, podendo ser implicados como reservatórios temporários do fungo no solo. O exato papel dos animais na ecologia de *Coccidioides* spp ainda permanece desconhecido. Emmons (1942) sugeriu que os roedores são os principais reservatórios do fungo na natureza, uma vez que carcaças, urina e fezes desses animais consistem na principal fonte de contaminação do solo.

O papel dos tatus (*Dasyus novemcinctus*) na ecologia do *C. posadasii* no Brasil foi estudado por Eulálio et al. (2001). Os autores relataram, pela primeira vez, a presença de tatus naturalmente infectados pelo fungo, no Estado do Piauí, e sugeriram a realização de estudos empregando esses animais como sentinelas para a detecção de áreas de risco de aquisição da coccidioidomicose.

O isolamento de *Coccidioides* spp. em amostras de solo foi realizado por diversos autores (BORGHI et al., 1977, WANKE et al., 1999; GREENE et al., 2000; CORDEIRO et al., 2006). De acordo com Greene et al. (2000), o melhor método para o isolamento do fungo no meio ambiente consiste na inoculação experimental de animais suscetíveis com amostras de solo. Segundo os autores, esse método permite a identificação definitiva de *Coccidioides* spp., uma vez que as esférulas produzidas em sua fase parasitária, *in vivo*, são estruturas exclusivas ao fungo. Embora não apresente exigências nutricionais *in vitro*, sabe-se que *Coccidioides* spp. possui distribuição esporádica no meio ambiente (GREENE et al., 2000), provavelmente em razão da sua reduzida capacidade enzimática de competição pelos nutrientes do solo (LACY & SWATEK, 1974).

1.2.2 A análise genética no entendimento da biologia de *Coccidioides* spp.

Nos últimos 50 anos, informações sobre diferentes aspectos da fisiologia, ecologia e patogênese de *Coccidioides* spp. têm sido proporcionadas por estudos com abordagens moleculares desses organismos. O sucesso de tais análises remonta aos estudos clássicos sobre genética do ascomiceto *Neurospora crassa* (BEADLE & TATUM, 1941), os quais, efetivamente, revolucionaram o conhecimento acerca da biologia dos fungos e influenciaram o delineamento das pesquisas sobre genética de microrganismos eucariontes.

O primeiro registro sobre a caracterização genética de *Coccidioides* spp. foi realizado por Foley et al. (1960), os quais conseguiram determinar a curva de sobrevivência de artroconídios do fungo, com o concomitante isolamento de mutantes auxotróficos avirulentos, após diferentes doses de exposição a raios X. Tais resultados direcionaram estudos posteriores, envolvendo mutagênese por agentes físicos e químicos e caracterização de aspectos da virulência fúngica em modelos animais (PULLIAM et al., 1967).

A caracterização genética de *Coccidioides* spp., no entanto, só foi possível após o desenvolvimento de técnicas modernas de análise molecular. Segundo Abuodeh et al., (2002), dados sobre ploidia e número de cromossomos dos artroconídios estavam sob investigação desde a década de 1960 e, desde então, foi suposto que a fase filamentosa do fungo caracterizava-se pela forma diplóide. Estudos citológicos posteriores apresentaram resultados conflitantes, questionando sobre a presença de 3 ou 4 cromossomos (SUN & HUPPERT, 1976). Dados recentes indicam que o artroconídio é uma célula haplóide que possui dois núcleos (ABUODEH et al., 2002). Através da técnica de cariotipagem eletroforética (PFGE), foi demonstrado que *C. immitis* possui quatro cromossomos, com genoma estimado em aproximadamente 29 Mpb (PAN & COLE, 1992).

Estudos moleculares são aplicados no entendimento das relações filogenéticas e história evolutiva de *Coccidioides* spp. Relações evolutivas entre *Coccidioides* spp. e espécies anamórficas e teleomórficas do gênero *Malbranchea* foram suscitadas dada a semelhanças na reprodução assexuada dessas espécies. A avaliação de caracteres derivados de análises bioquímica, imunológica e molecular sugeriu íntima relação filogenética de *Coccidioides* spp com o fungo saprófita *Uncinocarpus reesii*, bem como a inclusão de *C. immitis* na família Onygenaceae, a qual compreende espécies teleomórficas de *Malbranchea*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (PAN et al., 1994).

Zimmermann et al. (1994), utilizando endonucleases de restrição para digestão de DNA genômico (RFLP), foram os primeiros a demonstrar que, apesar de morfologicamente indistinguíveis, isolados de *Coccidioides* spp. poderiam ser reunidos em dois grupos genéticos distintos, de acordo com a sua origem geográfica: um grupo restrito à Califórnia e outro fora desta área. Tal observação levou Koufopanou et al. (1997) a avaliarem a origem evolutiva de cinco genes nucleares, para atestar de forma conclusiva se existia diferenciação geográfica entre populações de *C. immitis*, ou se esta era uma espécie panmítica, capaz de permitir recombinação entre todos os indivíduos. Os autores propuseram a divisão de *C. immitis* em dois taxa isolados reprodutivamente, com subgrupos formados em consonância com a origem geográfica dos isolados. Estudos posteriores confirmaram que *Coccidioides* spp. apresentava apenas diferenças genéticas, sendo então considerada uma espécie críptica, assim como *Auxarthron zuffianum* e *U. reesii*, os quais são evolutivamente relacionados ao fungo (KOUFOPANOU et al. 2001).

Em excelente estudo sobre a biogeografia de *Coccidioides* spp., Fisher et al. (2001) analisaram as seqüências de três genes - desoxigenase, serina proteinase e quitinase, bem como as freqüências alélicas em nove loci utilizando marcadores genéticos do tipo microssatélites, de populações oriundas da Califórnia, Arizona, Texas, México e América do Sul. Os autores concluíram que, apesar dos isolados procedentes da América do Sul possuírem os alelos representativos das populações norte-americanas, as freqüências alélicas de ambos os grupos mostravam grandes divergências. De fato, as freqüências alélicas agruparam filogeneticamente as populações da América do Sul e do Texas e, desta forma, os autores sugeriram que as populações de *Coccidioides* spp. procedentes da América do Sul originaram-se das populações norte-americanas, as quais co-migraram em associação com mamíferos suscetíveis, em um período ocorrido a cerca de 9.000 a 140.000 anos (Figura 4).

A divisão de *C. immitis* em duas espécies distintas foi proposta apenas em 2002, por Fisher et al., após análise molecular de marcadores do tipo microssatélites. De acordo com os autores, dois loci, *GAC2* e *621*, têm caráter discriminatório entre os isolados de *Coccidioides* spp. Deste modo, *C. immitis* e *C. posadasii* são consideradas espécies alopátricas, ou seja, com ocorrência em áreas geográficas distintas: a primeira está restrita à região da Califórnia, enquanto *C. posadasii* possui distribuição ampla, por todo o Continente Americano. Simpatria pode ocorrer apenas no sudoeste da Califórnia, onde *C. immitis* e *C. posadasii* coexistem (FISHER et al., 2001). Até o momento, apenas a análise de

polimorfismos de microssatélites é capaz de diferenciar *Coccidioides* spp. com precisão (FISHER et al., 2002).

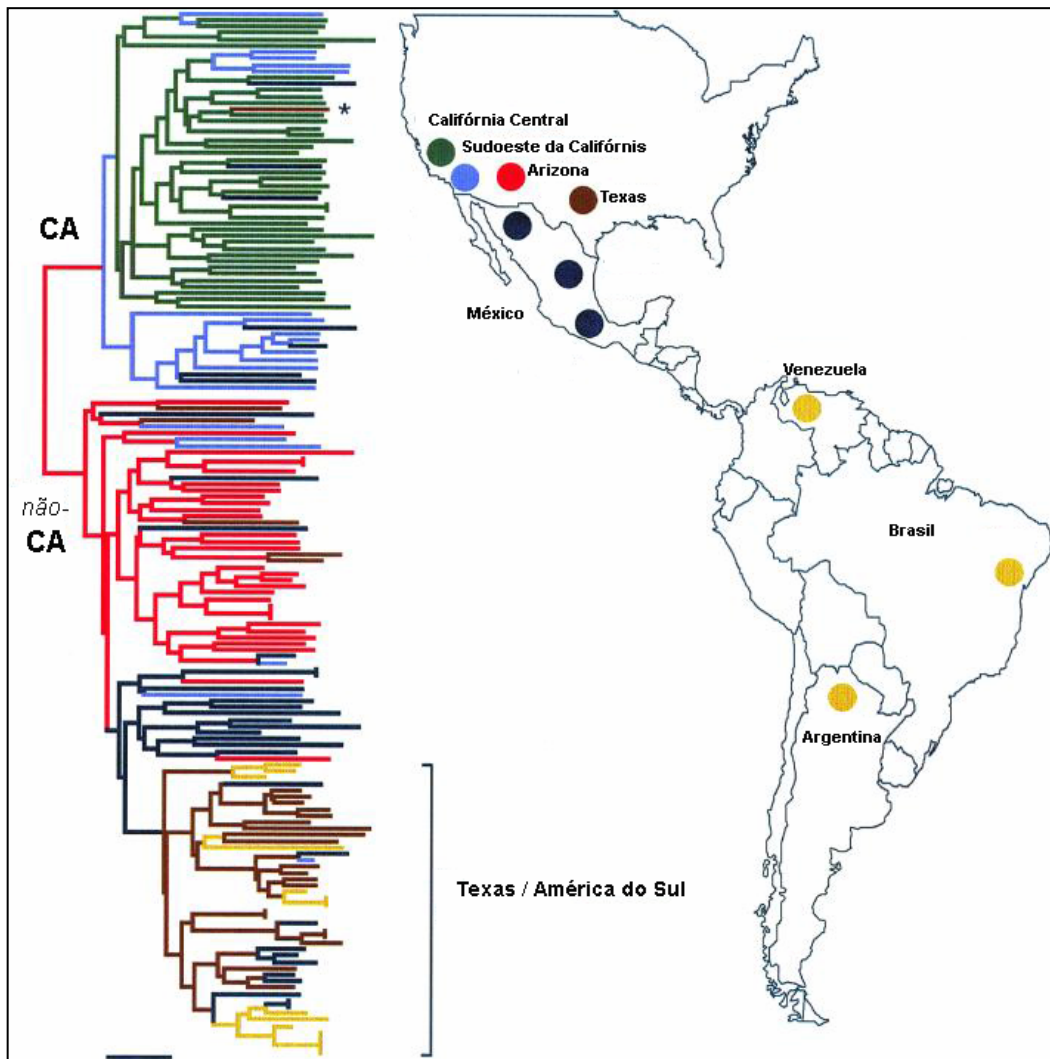


Figura 4. Dispersão de cepas de *C. immitis* californianas (CA) e não californianas (não CA) no Continente Americano. Figura modificada de Fisher et al. (2001).

1.3 Aspectos epidemiológicos da coccidioidomicose

A ocorrência da coccidioidomicose é determinada a partir de testes intradérmicos com coccidioidina ou esferulina, detecção de casos da doença e análises ambientais durante surtos epidêmicos (COX & MAGEE, 2004). Tais estudos revelam que a coccidioidomicose ocorre em áreas restritas do Continente Americano, entre 40°N 120°W no norte da Califórnia e 40°S 65°W no sul da Argentina (WANKE et al., 2005). Até 1992, a literatura especializada

reconhecia a existência de áreas endêmicas da doença em nove países: Estados Unidos, México, Honduras, Guatemala, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Argentina (WANKE et al, 2005). Apenas em 1998 o Brasil foi incluído na relação internacional de países com áreas endêmicas da doença (PAPPAGIANIS, 1998), com zonas circunscritas às zonas de semi-árido dos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia (COX & MAGEE, 2004), assim como apresentado na figura 5.

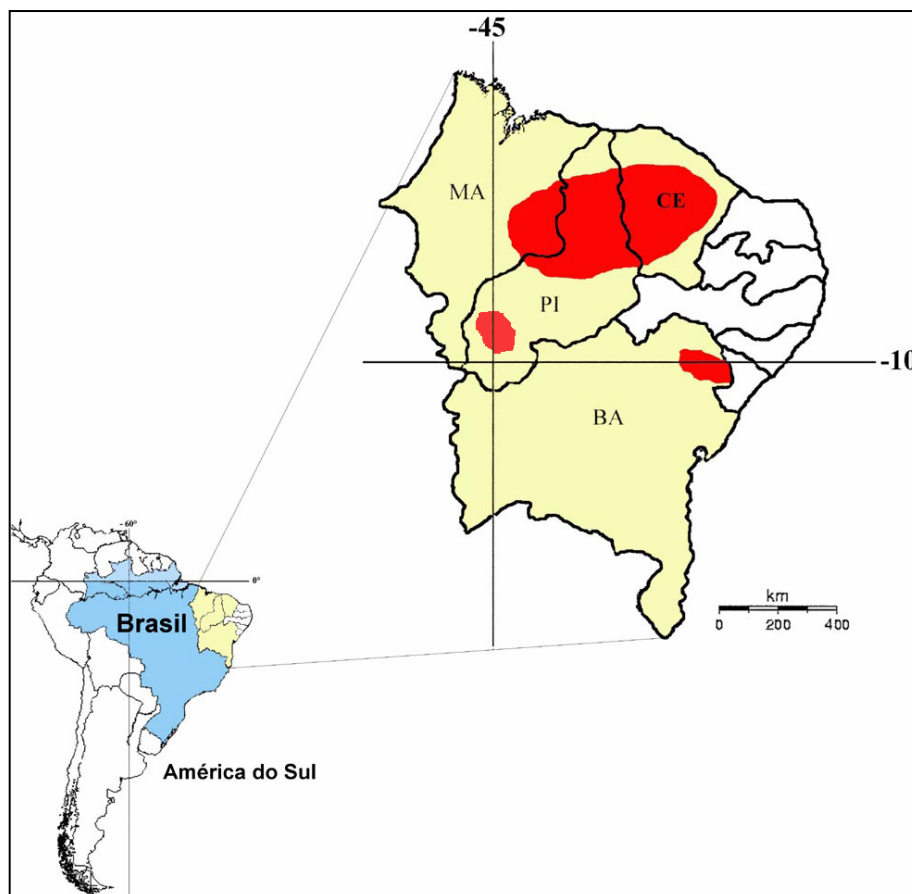


Figura 5. Distribuição espacial dos casos humanos autóctones de coccidiodomicose no Brasil, com ocorrência nos Estados do Maranhão (MA), Piauí (PI), Ceará (CE) e Bahia (BA).

A mais importante área de ocorrência da coccidiodomicose situa-se nos Estados Unidos, onde são estimadas aproximadamente 100.000 novas infecções anuais (BIALEK et al., 2004). No Brasil, a doença ocorre exclusivamente na região Nordeste, onde, desde 1978, aproximadamente 89 casos da doença foram notificados: Ceará - 12 casos (FECHINE, 2005), Piauí - 69 casos, Maranhão - 6 casos e Bahia - 2 casos (EULÁLIO et al., 2006). No Estado do Ceará, casos de coccidiodomicose têm sido registrados em pacientes oriundos dos

seguintes municípios: Aiuaba, Solonópole, Santa Quitéria, Boa Viagem, Independência, Catunda, Arneiroz, Ibiapina e Sobral (PAIXÃO et al., 2004; FECHINE, 2005). A área de ocorrência da coccidioidomicose no Ceará está mostrada na figura 6.

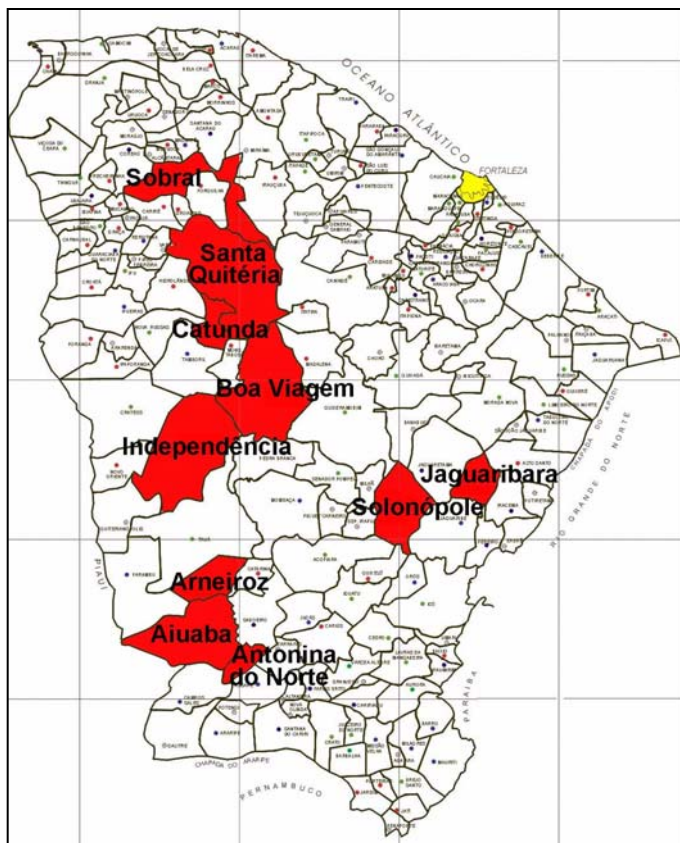


Figura 6. Distribuição atual dos casos de coccidioidomicose no Estado do Ceará. As áreas em vermelho correspondem aos municípios com casos confirmados da doença. Com base em Fechine (2005). Figura modificada a partir de mapa elaborado pelo IPLANCE (<http://www.iplance.ce.gov.br>).

Surtos epidêmicos de coccidioidomicose são associados a escavações em sítios arqueológicos, treinamentos militares em áreas endêmicas (CRUM et al., 2004, HECTOR & LANIADO-LABORIN, 2005), além dos distúrbios naturais, como terremotos e alterações climáticas (Comrie, 2005). No Brasil, a maioria dos casos notificados da doença teve vínculo epidemiológico com o hábito de escavar tocas de tatus da espécie *Dasytus novemcinctus* (WANKE et al., 1999; EULÁLIO et al., 2000). Amostras do solo coletadas próximo às tocas desses animais, no município de Solonópole, Estado do Ceará, forneceram culturas de *C. posadasii*, confirmando, assim, a origem ambiental da infecção (CORDEIRO et al., 2006).

Dados demográficos internacionais mostram que a coccidioidomicose-doença ocorre em todas as faixas etárias, mas os extremos de idade apresentam maior risco para complicações graves da doença, incluindo infecção pulmonar crônica e disseminação (CHILLER et al., 2003; CRUM et al., 2004). Diversos estudos comprovam que a coccidioidomicose possui maior ocorrência em homens, o que, provavelmente, está relacionado ao caráter ocupacional (CHILLER et al., 2003; CRUM et al., 2004). Apesar do risco de aquisição de coccidioidomicose não estar relacionado a nenhum grupo racial, sabe-se que a forma disseminada da doença ocorre mais frequentemente entre filipinos e negros (CHILLER et al., 2003; CRUM et al., 2004). Segundo Kirkland e Fierer (1985), a resistência à infecção por *C. immitis* parece estar determinada por características genéticas do hospedeiro.

Os casos de coccidioidomicose ocorridos no Brasil compartilham diversas informações clínico-epidemiológicas, conforme discutido por Wanke et al. (1999), que reconheceram a origem biogeográfica e o sexo dos pacientes como características comuns a todos os casos da doença (WANKE et al., 1999). As principais características dos casos autóctones de coccidioidomicose registrados no Brasil estão apresentadas no quadro 1.

Quadro 1 - Principais características dos casos autóctones de coccidioomicose no Brasil, registrados em literatura.

Ano	Procedência	No.	Sexo	Idade (anos)	Atividades de risco	Forma clínica	Tratamento	Evolução	Referência
1974	Paripiranga, Bahia	1	M	28	NI	Pulmonar	Cirurgia	Cura	Gomes et al. (1978)
1979	Floriano, Piauí	1	M	35	NI	Pulmonar	NI	NI	Vianna et al. (1979)
1989	Jaguaribara, Ceará	1	M	74	NI	Laríngea	CET, AMB	Cura	Kuhl et al. (1996)
1991	Oeiras, Piauí	3*	M	10, 24, 38	Caçada tatus	Pulmonar	AMB	Cura	Wanke (1994)
1995	Aiuaba, Ceará	4**	M	14, 19, 22, 28	Caçada tatus	Pulmonar	ITR, AMB	Cura	Silva et al. (1997)
1995	Miguel Leão, Piauí	1	NI	NI	Caçada tatus	NI	NI	NI	Wanke et al. (1999)
1996	Mirador, Maranhão	1	NI	NI	Caçada tatus	NI	NI	NI	Wanke et al. (1999)
1996	Bertolândia, Piauí	1	M	29	Escavação poços	Pulmonar	CET	Cura	Moraes et al. (1998)
1997	Monte Santo, Bahia	1	M	32	Caçada tatus	Pulmonar	CET	Cura	Martins et al. (1997)
1999	Independência, Ceará	1	M	21	Caçada tatus e Escavação poços	Pulmonar	AMB	Óbito	Silva et al. (1999)
2000	Boa Viagem, Ceará	1	M	19	Caçada tatus	Pulmonar	AMB	Óbito	Costa et al. (2001)
2001	Piauí	1	M	22	NI	Disseminada	AMB	Óbito	Martinez et al. (2002)
2001	Solonópole, Ceará	1	M	29	Caçada tatus	Pulmonar	AMB, FLU	Cura	Fechine (2005)
2002	Bertolândia, Piauí	1	M	20	Caçada tatus, Escavação poços	Pulmonar	AMB	Óbito	Veras et al. (2002)
2002	Catunda, Ceará	1	M	24	Caçada tatus	Pulmonar	AMB, FLU	Cura	Fechine (2005)
2002	Santa Quitéria, Ceará	1	M	27	Caçada tatus	Pulmonar	AMB, FLU	Cura	Fechine (2005)
2003	Santa Quitéria, Ceará	1	M	43	Caçada tatus	Pulmonar	FLU	Cura	Fechine (2005)

2003	Solonópole, Ceará	1	M	32	Caçada tatus	Pulmonar	ITR	Cura	Fechine (2005)
2004	Arneiroz, Ceará	1	M	13	Caçada tatus	Pulmonar	FLU	Cura	Fechine (2005)

*8 cães; ** 2 cães

NI: não informado; CET: cetoconazol; AMB: anfotericina B; FLU: fluconazol; ITR: itraconazol

1.4 Patogenia e formas clínicas

A coccidioidomicose é adquirida, principalmente, por via inalatória (GALGIANI et al., 2005). Dados experimentais obtidos com animais de laboratório indicam que uma pequena quantidade de artroconídios administrados por via intranasal é suficiente para produzir infecção (GALGIANI, 1993, CHILLER et al., 2003). Em seres humanos, a exposição a grande quantidade de inóculo está relacionada com a redução do período pré-patente da doença e a gravidade do quadro clínico (CRUM et al., 2004; GALGIANI, 1993).

Após a inalação por hospedeiro suscetível, os artroconídios sofrem invaginação da parede celular, originando esférulas com endósporos no seu interior (BIALEK et al., 2004). Em virtude do seu tamanho reduzido, geralmente menor do que 10 µm, os artroconídios escapam dos mecanismos de defesa constitutivos do hospedeiro e alcançam os brônquios terminais (CHILLER et al., 2003; COX & MAGEE, 2004). A resposta inicial desenvolvida pelas estruturas infectantes do *Coccidioides* spp. caracteriza-se por um influxo de leucócitos polimorfonucleares, os quais parecem responder às quimiotoxinas formadas durante a ativação do complemento (CHILLER et al., 2003). Nas 72 horas que sucedem a inalação, os artroconídios são convertidos em esférulas e a resposta inflamatória caracteriza-se por uma infiltração celular, a qual se mantém durante todo o processo infeccioso, podendo formar granulomas (CHILLER et al., 2003; COX & MAGEE, 2004). Subseqüente liberação dos endósporos a partir das esférulas maduras leva a uma resposta do tipo polimorfonuclear, possivelmente estimulada por substâncias liberadas pelas estruturas parasitárias do fungo (CHILLER et al., 2003). Dados experimentais, *in vitro*, mostram que os leucócitos polimorfonucleares não conseguem eliminar as esférulas maduras (CHILLER et al., 2003). Tal resultado pode estar relacionado com a persistência das esférulas no hospedeiro, apesar da potente resposta inflamatória elicitada por essas estruturas (GALGIANI, 1993).

Diversos fatores de virulência de *Coccidioides* spp. foram determinados a partir de ensaios com animais. Moléculas de adesinas expressas pelas esférulas (Hung et al., 2002); além de várias enzimas, tais como urease (MIRBOD-DONOVAN et al., 2006), metaloproteinase (HUNG et al., 2005) e IgG e IgA proteases (YUAN & COLE, 1987), parecem desempenhar papel importante na patogenia e virulência do fungo.

Apesar de *C. posadasii* e *C. immitis* diferirem quanto à composição de algumas proteínas, tais como serina proteinase e antígeno *prolin-rich*, bem como no perfil genético

(FISHER et al., 2002), até o presente momento, não se sabe se as referidas espécies possuem diferenças quanto à patogenicidade em seres humanos (HUNG et al., 2005).

Classicamente, a coccidioidomicose pode apresentar as seguintes formas clínicas: assintomática, pulmonar aguda, pulmonar crônica, disseminada e cutânea primária (CHILLER et al., 2003; GALGIANI et al. 2005). Segundo Galgiani (1993), até 65% dos indivíduos expostos aos artroconídios infectantes não desenvolvem sintomas da doença, sendo detectados apenas em inquéritos soropidemiológicos e conversões positivas em testes intradérmicos com coccidioidina e/ou esferulina. Infecção sintomática pode ocorrer em aproximadamente 40% dos indivíduos expostos, após 10 a 16 dias de incubação, em média (COX & MAGEE, 2004). Diversos autores mostraram que, durante surtos epidemiológicos ocorridos após terremotos, construções ou escavações de sítios arqueológicos, o índice de indivíduos sintomáticos pode chegar até 90% (SCHNEIDER et al., 1997; CRUM et al., 2002). Segundo Cairns et al. (2000), a exposição primária a grande quantidade de artroconídios está associada ao crescimento da incidência da infecção sintomática.

A forma pulmonar aguda pode cursar com uma grande diversidade de sintomas clínicos, tais como, tosse com ou sem expectoração, febre, dor torácica, dor de cabeça, hemoptise, fadiga muscular e anorexia (GALGIANI et al., 1993; CHILLER et al., 2003; COX & MAGEE, 2004). Segundo Cox e Magee (2004), 5% dos pacientes desenvolvem manifestações do tipo eritema nodoso e/ou eritema multiforme, resultantes de reações de hipersensibilidade do tipo tardia, as quais são mais freqüentes no sexo feminino (GALGIANI, 1993). A forma pulmonar primária sintomática pode regredir espontaneamente ao curso de alguns meses, mesmo sem terapia específica (CRUM et al., 2004).

Aproximadamente 5% dos pacientes com pneumonia primária não apresentam cura espontânea e podem evoluir para uma infecção pulmonar crônica, a qual se manifesta por lesões nodulares ou doença pulmonar fibrocavitária (CRUM et al., 2004). Clinicamente, a doença se caracteriza pela presença de suores noturnos, fadiga muscular, perda de peso, tosse crônica e hemoptise (CHILLER et al., 2003; CRUM et al., 2004). Em razão das semelhanças clínicas, radiográficas e histopatológicas, a coccidioidomicose pulmonar progressiva pode ser confundida com a tuberculose pulmonar, devendo, portanto, ser estabelecido diagnóstico diferencial (CASTAÑEDA-GODOY & LANIADO-LABORIN, 2002). No Brasil, a doença costuma ser confundida com tuberculose e relatos da literatura atestam que, a despeito de

exame bacteriológico negativo, alguns pacientes são submetidos, erroneamente, a tratamento para tuberculose (GOMES et al., 1978; MORAES et al., 1998).

A forma disseminada da coccidioidomicose pode ocorrer entre 1 a 5% dos indivíduos infectados com *Coccidioides* spp. (CRUM et al., 2004), apesar da ausência de sinais clínico ou radiológico de comprometimento pulmonar (COX & MAGEE, 2004). A forma disseminada acomete, com maior frequência, indivíduos adultos imunossuprimidos, tais como pacientes com aids, linfomas ou transplantados (GALGANI et al., 2005). A disseminação fúngica ocorre por vias hematogênica e/ou linfática, e pode atingir vários órgãos, como pele, sistema nervoso central, linfonodos, ossos, articulações e aparelho urogenital (GALGANI, 1993; CRUM et al., 2004). Quando não diagnosticada e tratada corretamente, a coccidioidomicose disseminada apresenta elevado índice de mortalidade (GALGANI et al., 2005). No Brasil, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) recomenda o diagnóstico diferencial com a *Leishmaniose visceral* (calazar), sobretudo nas áreas de ocorrência de ambas as enfermidades.

A coccidioidomicose cutânea primária ocorre após inoculação traumática de estruturas fúngicas e está associada a acidentes de laboratório (COX & MAGEE, 2004). Manifestações dermatológicas incluem pápulas, nódulos e placas verrucosas que podem evoluir para a formação de úlceras e abscessos (CRUM et al. 2004). Em decorrência da diversidade clínica das lesões, a coccidioidomicose cutânea pode ser confundida com várias outras enfermidades e, desta forma, a confirmação laboratorial, através de cultura e / ou exame histopatológico das lesões, se faz necessária (CRUM et al., 2004).

1.5 Perfil de sensibilidade de *Coccidioides* spp. frente a drogas antifúngicas

O perfil de sensibilidade de *Coccidioides* spp. ante drogas antifúngicas é determinado mediante teste de macrodiluição padronizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), por meio do protocolo M38-A. O método destina-se à realização de testes com fungos filamentosos que causam infecções invasivas e conidiogênese rápida, tais como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii*. O protocolo M38-A é usado, com sucesso, em estudos envolvendo fungos dimórficos em fase filamentosa, tais como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp., *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Penicillium marneffei* e *Sporothrix schenckii* (NCCLS, 2002). É importante

salientar, entretanto, que a correlação entre os dados obtidos *in vitro* e testes *in vivo* só foi avaliada em modelos animais (GONZÁLEZ et al., 2001).

Dentre os antifúngicos utilizados para o tratamento da coccidioidomicose, a Anfotericina B é considerada a droga de escolha para as formas graves da doença (GALGIANI et al., 2005). A anfotericina B é o único representante de uma família de aproximadamente 200 antibióticos macrolídeos poliênicos que apresenta atividade clínica contra várias espécies patogênicas, tais como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* (MANDELL & PETRI, 2003). A atividade antifúngica da droga depende de sua ligação ao ergosterol presente na membrana plasmática fúngica, levando à formação de poros na estrutura. Como consequência, a droga causa aumento na permeabilidade da membrana, levando ao extravasamento de vários compostos de baixo peso molecular (MANDELL & PETRI, 2003).

Diversos estudos demonstram que *Coccidioides* spp. apresenta sensibilidade *in vitro* a anfotericina B (LUTZ et al., 1997; LI et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2001; NAKAI et al., 2003). Estudo realizado por González et al. (2002) demonstrou que hifas e artroconídios de *C. immitis* apresentavam o mesmo perfil de sensibilidade, *in vitro*, diante da droga.

Segundo Galgiani et al. (2005), o tratamento da coccidioidomicose deve ser individualizado, na dependência da forma clínica apresentada pelo paciente. Alguns autores citam que os antifúngicos azólicos, principalmente o cetoconazol, o fluconazol e o itraconazol, substituem a anfotericina B no tratamento da coccidioidomicose pulmonar crônica (GALGIANI et al., 2000; GALGIANI et al., 2005).

Os antifúngicos azólicos compreendem os compostos imidazóis e triazóis, os quais agem inibindo a 14- α -demetilase, uma enzima que faz parte do sistema enzimático do citocromo P450, com a consequente alteração da biossíntese do ergosterol da membrana plasmática fúngica e acúmulo de 14- α -metilesteróis (MANDELL & PETRI, 2003). Tais compostos, por sua vez, podem alterar a estrutura das moléculas dos fosfolipídios e prejudicar as funções de alguns sistemas enzimáticos, tais como ATPases e a cadeia de transporte de elétrons (MANDELL & PETRI, 2003).

Diversas pesquisas comprovaram que *Coccidioides* spp. não exibem resistência, *in vitro*, ante o fluconazol e itraconazol (LI et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2002; LETSCHER-

BRU & HERBRECHT, 2003; NAKAI et al., 2003). Gonzalez et al. (2002), no entanto, afirmam que apenas 60% dos pacientes podem ser responsivos ao tratamento com essas drogas. Apesar do cetoconazol ser recomendado para o tratamento de formas crônicas de coccidioidomicose (GALGIANI et al., 2000), poucos estudos foram realizados a fim de se determinar o perfil de sensibilidade de *Coccidioides* spp. a essa droga *in vitro* (HOEPRICH & MERRY, 1984; PAPPAGIANIS et al., 1990).

Atualmente, novas drogas têm sido testadas contra isolados clínicos de *Coccidioides* spp. Resultados promissores foram alcançados com os antifúngicos voriconazol e caspofungina, os quais apresentaram eficácia *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2000; DERESINSKI, 2001; GONZÁLEZ et al, 2001, 2002; HSUE et al, 2004; PARK et al., 2006).

O voriconazol é um derivado triazólico de 2ª geração, que exibe atividade antifúngica contra várias espécies, incluindo *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Scedosporium apiospermum*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* (Greer, 2003). Em virtude da sua boa penetração no sistema nervoso central, a droga é recomendada para o tratamento de meningite causada por *Coccidioides* spp. (CORTEZ et al., 2003; PROIA E TENORIO, 2004). Segundo Li et al. (2000), o voriconazol exerce efeito fungistático, *in vitro*, sobre cepas de *C. immitis*.

A caspofungina é um hexapeptídeo cíclico, pertencente a uma nova classe de compostos antifúngicos, as equinocandinas, que agem diretamente na parede celular fúngica, interrompendo a síntese de β -(1,3)-D-glucanos (LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003). Diversos estudos mostram que a droga exibe potente atividade *in vitro* contra cepas de *Candida* spp resistentes a anfotericina B e fluconazol, *Aspergillus* spp. e fungos dimórficos (GONZÁLEZ et al., 2001). Em estudo com coccidioidomicose experimental em camundongos, González et al (2001) provaram que a droga possui excelente ação terapêutica, apesar de apresentar limitada atividade *in vitro*. Recentemente, Park et al. (2006) sugeriram a associação de caspofungina e fluconazol para o tratamento da coccidioidomicose disseminada.

1.6 Diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose

No Brasil, a coccidioidomicose não é doença de notificação compulsória, mas o Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) recomenda, como medida de vigilância epidemiológica, o diagnóstico e tratamento precoce de todos os casos. Uma vez que a coccidioidomicose não apresenta achados clínico-radiológicos clássicos, podendo ser confundida com outras doenças infecciosas, especialmente a tuberculose, a confirmação laboratorial é imprescindível para seu diagnóstico definitivo (GALGANI, 1993). As principais abordagens atuais para o diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose baseiam-se em técnicas micológicas, sorológicas e moleculares.

1.6.1 Diagnóstico micológico

O exame direto do espécime clínico é realizado por microscopia óptica em preparações do tipo lâmina-lamínula e esfregaços. Uma vez que os espécimes devem ser representativos do sítio de infecção, diversas amostras podem ser encaminhadas ao laboratório de Micologia, na dependência da forma clínica da doença. Desta forma, a pesquisa de *Coccidioides* spp. pode ser realizada em secreções respiratórias, tais como escarro e lavado broncoalveolar; líquido cefalorraquidiano; aspirados de lesões ósseo-articulares; líquido pleural; além de biopsias de pele e tecido pulmonar (GALGANI, 1993).

Para montagens entre lâmina e lamínula, o material clínico é imerso em substância clarificante, tal como KOH em concentração de 30%, ou K-tinta para facilitar a visualização das estruturas parasitárias; esfregaços e *imprints* podem ser corados pela prata metenamina (SIDRIM et al., 2004). Ao exame direto, são observadas esférulas de até 80 μ m de diâmetro, com parede birrefringente e endósporos no seu interior (GALGANI, 1993), as quais podem ser confundidas com outros agentes fúngicos, em especial o da paracoccidioidomicose (WANKE et al., 2005). Estruturas filamentosas artroconidiadas, no entanto, podem ser formadas em lesões cavitárias ou no espaço pleural (KAUFMAN et al., 1998; KE et al., 2006).

Culturas primárias, oriundas de espécimes clínicos, apresentam rápido desenvolvimento em aproximadamente 5 a 10 dias de incubação a 25 °C em ágar Sabouraud dextrose a 2%, suplementado ou não com antimicrobianos, tais como cloranfenicol e

cicloheximida. Após esse período, são formadas colônias algodonosas de coloração branca, que podem ser alvo de mudanças morfológicas ao longo do tempo (DE HOOG et al., 2001; PAIXÃO et al., 2004). A análise microscópica do micélio revela hifas hialinas septadas com aproximadamente 3,5 a 5,0 μm de largura que, com a maturação, originam artroconídios intercalados por células disjuntoras (DE HOOG et al., 2001). As características morfológicas de *Coccidioides* spp. empregadas no diagnóstico micológico estão ilustradas na figura 7.

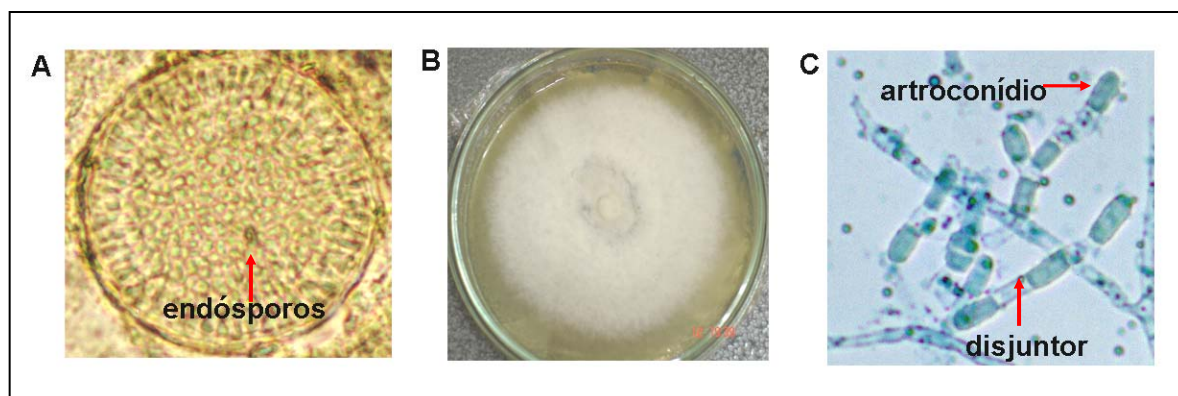


Figura 7. Diagnóstico micológico de *Coccidioides* spp. **A:** achado de esférula madura contendo numerosos endósporos no seu interior. **B:** aspecto macromorfológico da colônia em ágar Sabouraud dextrose a 2%. **C:** aspecto micromorfológico da cultura filamentosa, mostrando artroconídios intercalados por disjuntoras.

A identificação laboratorial baseada em cultivos artificiais do fungo está restrita a laboratórios com nível de contenção biológica 3 (COX & MAGEE, 2004). Infecções contraídas após manipulação de culturas de *Coccidioides* spp. têm sido relatadas (DRUNTZ & CATANZARO, 1978; WU et al., 2003).

Segundo Galgiani (1993), a confirmação do diagnóstico micológico de *Coccidioides* spp. é realizada mediante reversão da forma filamentosa para a parasitária em animais de laboratório ou em meio líquido quimicamente definido, cuja fórmula foi elaborada por J. L. Converse, em 1955. Uma fórmula mais eficiente para reversão de *Coccidioides* spp. foi descrita por Petkus et al. (1985), a partir do meio sintético RPMI 1640 e o detergente N-tamol.

1.6.2 Diagnóstico imunológico

O diagnóstico imunológico da coccidioidomicose baseia-se na detecção da resposta celular e / ou humoral produzida pelo hospedeiro. Diversos estudos comprovam que, na coccidioidomicose, a imunidade protetora está associada a uma adequada resposta celular, mediante ativação de linfócitos T auxiliares e produção de citocinas, particularmente interleucina-2, interferon gama e fator de necrose tumoral (AMPEL, 2003).

A ativação dos linfócitos T auxiliares pode ser demonstrada mediante positividade à prova cutânea aos antígenos coccidioidina ou esferulina, produzidos a partir das formas filamentosas ou parasitárias do fungo, respectivamente. O estudo da resposta celular na coccidioidomicose pode ser empregado em testes de diagnóstico, prognóstico e, mais comumente, para inquéritos epidemiológicos (AMPEL, 2003, ELIAS COSTA, 1995).

Trabalhos pioneiros de Smith et al. (1948) demonstraram que, após um prazo máximo de três semanas depois do início dos sintomas clínicos, a reação aos antígenos de *Coccidioides* spp. pode ser detectada em testes cutâneos. Uma vez que essa resposta imunológica é duradoura, a reatividade aos antígenos fúngicos pode ter pouco valor no diagnóstico da doença, estando relacionada a infecção atual ou passada (ELIAS COSTA, 1995). A conversão de um reator negativo a positivo, no entanto, pode ser útil para indicar infecção recente pelo fungo (AMPEL, 2003). Pacientes com intradermoreação positiva para coccidioidina e / ou esferulina têm melhor prognóstico e aqueles cujos testes são negativados durante o processo infeccioso possuem prognóstico grave (ELIAS COSTA, 1995; AMPEL, 2003). Estudos *in vivo* mostram que ausência de resposta de hipersensibilidade tardia está associada às formas disseminadas da doença (AMPEL, 2003).

Os primeiros testes para detecção da resposta imune humoral na coccidioidomicose foram realizados por Cooke (1914), o qual utilizou culturas de *Coccidioides* spp. trituradas como antígeno fúngico. Desde então, diversos estudos têm demonstrado o valor da resposta sorológica como critério de diagnóstico na coccidioidomicose (MARTINS, 1995; PAPPAGIANIS, 2001; PAPPAGIANIS, 2004).

Os métodos diagnósticos mais importantes para a detecção da resposta sorológica específica para a doença são imunodifusão em gel, contraímunoeletroforese, fixação do

complemento, aglutinação em látex e ELISA (AMPEL, 2003; PAIXÃO et al., 2004). Esses testes baseiam-se na detecção de anticorpos direcionados a duas importantes classes de antígenos de *Coccidioides* sp.: TP (*tube precipitin*) e CF (*complement fixation*), para detecção de imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG), respectivamente (MARTINS et al., 1995; PAPPAGIANIS, 2004). É importante salientar que cada método possui diferentes níveis de sensibilidade e especificidade e a sua implementação em laboratórios de rotina clínica é dependente, ainda, do custo dos reagentes, exequibilidade e reprodutibilidade da técnica. A pesquisa de anticorpos pode ser realizada em diversos espécimes clínicos, tais como soro, líquido, líquido pleural, líquido peritoneal e sinóvia (PAPPAGIANIS, 2001), na dependência da padronização de cada técnica.

Atualmente, diferentes protocolos para obtenção de frações antigênicas de *Coccidioides* spp. são utilizados. Dados da literatura indicam que grande diversidade de moléculas obtidas a partir de culturas filtradas ou lisadas, mantidas em diferentes meios de cultura e condições de crescimento, podem ser utilizadas em testes de imunodiagnóstico (CALHOUN et al., 1986; ELIAS COSTA, 1995; MARTINS, 1995; PAPPAGIANIS, 2001). Antígenos obtidos a partir de micélio ou esférulas de *Coccidioides* spp. têm sensibilidades equivalentes *in vitro* (CALHOUN et al., 1986). Segundo Pappagianis (2001), apesar das diferenças fenotípicas e genotípicas entre as cepas de *Coccidioides* spp., as preparações antigênicas podem ser derivadas a partir de apenas uma cepa específica do fungo. Atualmente, o diagnóstico imunológico da coccidioidomicose é realizado com antígenos obtidos a partir de cepas norte-americanas de *Coccidioides* spp. A elaboração de antígenos a partir de cepas locais pode resultar em testes imunológicos de custo reduzido, adequados aos laboratórios de diagnóstico laboratorial.

Para o diagnóstico de coccidioidomicose pulmonar aguda, os testes devem ser direcionados para moléculas de IgM, as quais podem ser detectadas aproximadamente 7 dias após o início dos sintomas (PAPPAGIANIS & ZIMMER, 1990). Após 6 semanas de evolução da doença, os títulos de IgM tornam-se bastante reduzidos, podendo ser detectados apenas em aproximadamente 10% dos indivíduos com doença não disseminada (PAPPAGIANIS, 2001). Na forma disseminada da doença, no entanto, anticorpos IgM podem ser detectados por vários anos após a infecção primária (PAPPAGIANIS & ZIMMER, 1990).

A detecção de anticorpos IgG pode ser realizada entre 2 a 3 semanas após o início dos sintomas, através das técnicas de imunodifusão, fixação do complemento e ELISA

(PAPPAGIANIS, 2001). Após análise qualitativa, a titulação de IgG se faz necessária, uma vez que diversos estudos correlacionam títulos elevados com a disseminação e gravidade da doença (PAPPAGIANIS, 2001).

Outra abordagem de diagnóstico imunológico da coccidioomicose envolve a detecção de antígenos fúngicos circulantes (Galgiani et al., 1991), uma vez que, em alguns pacientes, a detecção de antígenos no soro precede a detecção de anticorpos. Segundo Pappagianis (2001), essa estratégia pode ser útil especialmente em pacientes imunocomprometidos ou ainda, para confirmar o diagnóstico da doença no início de processo infeccioso.

Resultados sorológicos falsonegativos podem ocorrer em pacientes transplantados, leucêmicos ou com outras condições imunossupressoras (PAPPAGIANIS, 2001; JOHNSON et al., 2004). Resultados falsopositivos são associados à técnica de aglutinação em látex (PAPPAGIANIS & ZIMMER, 1990; MARTINS et al., 1995). Desta forma, os resultados dos testes imunológicos devem ser analisados, quando possível, em conjunto com o diagnóstico micológico, histopatológico e / ou molecular.

1.6.3 Diagnóstico molecular

Segundo alguns autores, o diagnóstico laboratorial da coccidioomicose baseado em técnicas moleculares é bastante promissor, pois permite a eliminação do manuseio de culturas de *Coccidioides* spp. em forma filamentosa, além da detecção do DNA do fungo antes da soroconversão ou ainda, em amostras clínicas contaminadas e culturas mistas (JOHNSON et al., 2004; BIALEK et al., 2005).

Os primeiros estudos envolvendo identificação molecular de *C. immitis* foram realizados por Pan e Cole (1995), os quais estabeleceram um protocolo baseado em PCR para a amplificação de uma sequência de 520 pb do gene *csa*. Segundo os autores, o gene *csa* codifica para uma molécula antigênica termoestável de 19 KDa, específica para o fungo.

A identificação molecular de *Coccidioides* spp. é realizada mediante análises do *cluster* de genes do DNA ribossomal (GREENE et al., 2001; JOHNSON et al., 2004). Os genes do DNA ribossômico estão agrupados em uma unidade ou “*cluster*”, a qual ocorre

numerosamente como repetições em *tandem* distribuídas em único cromossomo (Figura 8). Em eucariotos, essa região compreende 4 subunidades distintas, que codificam os genes ribossômicos 18S, 28S, 5S e 5,8S (MITCHELL et al., 1995). Localizado entre os genes 18S, 28S, 5S e 5,8S, encontram-se os domínios ITS (*Internal Transcribed Spacers*); o *cluster* de genes do DNA ribossômico é separado pela região IGS (*Intergenic Spacer*), a qual é formada pelos domínios NTS (*Non-transcribed Spacers*) e ETS (*Externally Transcribed Spacer*).

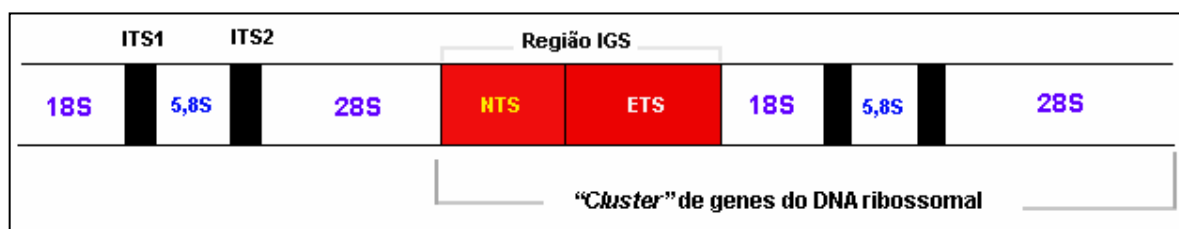


Figura 8. Esquema representativo da organização do *cluster* de genes do rDNA, no sentido 5'-3'. As regiões em vermelho correspondem às seqüências do gene que não são transcritas. Figura baseada em MITCHELL et al.(1995).

De acordo com Greene et al. (2001), *C. immitis* pode ser distinguido de outros fungos filamentosos mediante a amplificação dos genes do rDNA por *multiplex* PCR, utilizando-se quatro oligoiniciadores simultâneos em condições de alta estringência, possibilitando resultados específicos para o fungo em questão. A identificação molecular de *Coccidioides* spp., a partir de uma única reação de amplificação dos genes do rDNA, foi padronizada por Johnson et al. (2004), em amostras de sangue de pacientes e animais infectados experimentalmente.

Para *C. posadasii*, o diagnóstico molecular a partir de culturas filamentosas ou biopsias de pele e pulmão foi definido tendo como alvo a seqüência genética parcial da molécula “antígeno 2” ou “PRA” (BIALEK et al., 2004), a partir de protocolos baseados em *nested* PCR. O gene *pra* possui 1390 pb e codifica um antígeno específico de *Coccidioides* spp., com potencial de uso em esquemas vacinais. As reações de PCR amplificam seqüências de 526 pb e 342 pb (BIALEK et al., 2004), conforme demonstrado na figura 9.

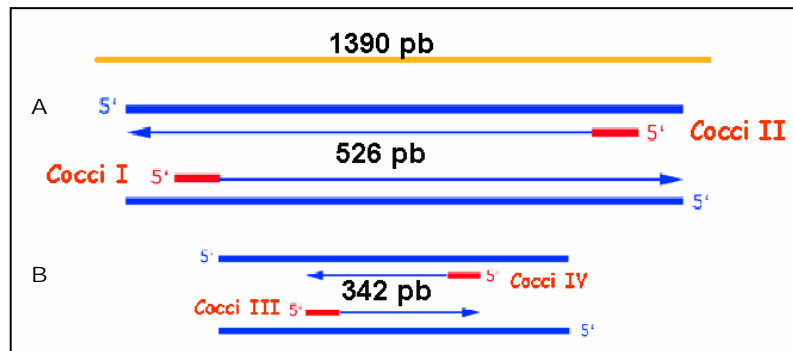


Figura 9. Esquema de reação de amplificação do gene *pra*, específico para *Coccidioides* spp. **A:** primeira reação de PCR, com amplificação de seqüência de 526 pb, através dos oligonucleotídeos Cocci I e Cocci II. **B:** segunda reação de PCR, com amplificação de seqüência de 342 pb, através dos oligonucleotídeos Cocci III e Cocci IV. A seqüência completa do gene possui 1390 pb, conforme representado pela barra superior. Com base em Bialek et al. (2004).

A identificação molecular de *Coccidioides* spp. também é realizada mediante técnicas de hibridização de ácidos nucléicos, associadas ou não a PCR. Sondas comerciais quimiofluorescentes (“*AccuProbe*”) para identificação de *C. immitis* são produzidas pela empresa *GenProbe* e estão disponíveis comercialmente (SANDHU et al., 1995; LINDSLEY et al., 2001). Apesar de constituir método de elevadas sensibilidade e especificidade, Gromadzki et al. (2000) demonstraram que a detecção de *C. immitis* baseada em tais sondas de hibridização está sujeita a resultados falsonegativos quando se utilizam biópsias preservadas em formol.

Atualmente, as técnicas disponíveis para obtenção de DNA e/ ou RNA *Coccidioides* spp. contemplam culturas em fase filamentosa ou alguns espécimes clínicos, tais como sangue e biópsias. Burt et al. (1995) padronizaram uma técnica para extração de DNA de *Coccidioides* spp. em culturas filamentosas. Em resumo, o protocolo envolve, após crescimento das culturas em caldo e inativação em autoclave, o tratamento com nitrogênio líquido, seguido de liofilização e lise com SDS e proteinase K. O DNA é extraído com fenol-clorofórmio e, em seguida, precipitado com isopropanol.

A extração de ácidos nucleicos de *Coccidioides* spp. em amostras clínicas pode ser realizada por intermédio dos kits *QIAamp DNA blood mini kit* e *QIAamp tissue kit*, ambos comercializados pela empresa *Quiagen*. Segundo o fabricante, esses kits permitem a obtenção de DNA e/ou RNA do fungo após lise da amostra e adsorção do ácido nucleico em colunas de afinidade, conforme apresentado na figura 10.

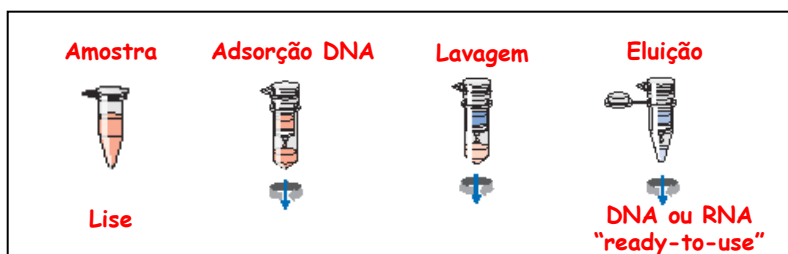


Figura 10. Esquema de extração de DNA de *Coccidioides* spp., a partir de amostra de sangue ou biopsia, em kits comercializados pela empresa *Quiagen*. Figura modificada a partir de manual eletrônico disponível no site <http://www.who.int>.

Embora tais kits envolvam protocolos de fácil manipulação e permitam a obtenção de resultados em tempo reduzido, seu uso está limitado apenas a sangue, soro ou biopsias. Sabe-se que a coccidioidomicose é uma infecção predominantemente pulmonar e casos de fungemia são raros (AMPEL et al., 1986). Desta forma, é bastante questionável a viabilidade de técnicas moleculares utilizando-se sangue como amostra biológica única. Além disso, biopsias pulmonares são espécimes clínicos de obtenção difícil, envolvendo procedimentos invasivos e médicos especializados, não sendo consideradas amostras preferenciais para o diagnóstico da coccidioidomicose (PAIXÃO et al., 2004).

Conforme discutem Millar et al. (2003), a identificação de *C. immitis* baseada em dados moleculares está sujeita a ambigüidades, porquanto a espécie compartilha até 98% de homologia de seqüências do rDNA com *Chrysosporium keratinophyllum*. Desta forma, o diagnóstico de *C. immitis* baseado apenas em técnicas moleculares pode produzir resultados discrepantes até mesmo com espécies fúngicas morfológicamente distintas do patógeno em foco.

Atualmente, as técnicas de Biologia Molecular ainda não permitiram a fácil distinção entre os agentes etiológicos da coccidioidomicose. Os fungos *C. immitis* e *C. posadasii* são morfológicamente indistinguíveis, sendo diferenciados apenas por meio de

análise de microsátélites (FISHER et al., 2002), uma técnica de aplicação difícil em laboratórios de rotina clínica.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da coccidioomicose ser endêmica no Estado do Ceará, estudos sobre essa temática, na região, têm se limitado à descrição de casos clínicos. Desta forma, até o presente momento, dados sobre aspectos fenotípicos das cepas de *C. posadasii* isoladas na região são praticamente desconhecidos. Acredita-se que o estudo de aspectos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos dessas cepas será importante para compreensão da etiopatogenia e ecologia da coccidioomicose no Brasil, podendo, inclusive, suscitar dados que permitam a diferenciação entre as espécies *C. immitis* e *C. posadasii*.

A grande variedade de formas clínicas da coccidioomicose pode levar a confusão diagnóstica com outras enfermidades, tais como tuberculose e leishmaniose - duas importantes infecções endêmicas no Estado do Ceará. De fato, a análise dos dados da literatura revela freqüente confusão diagnóstica entre coccidioomicose e tuberculose (GOMES et al., 1978; MORAES et al., 1998; CASTAÑEDA-GODOY & LANIADO-LABORIN, 2002; FECHINE, 2005). Por conseguinte, foi aventada a hipótese de que os antimicrobianos utilizados para o tratamento da tuberculose pulmonar e da leishmaniose visceral exercem efeito inibitório sobre *C. posadasii*.

Diante desse cenário, é provável que os casos de coccidioomicose notificados no Estado do Ceará representem apenas um perfil subestimado do espectro da doença na região. Às dificuldades do diagnóstico clínico da coccidioomicose, somam-se as limitações técnicas de manipulação das culturas do patógeno, as quais estão restritas a laboratórios com nível de biossegurança 3. Todas essas questões impulsionam pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias que facilitem o diagnóstico laboratorial da doença no Brasil. Assim sendo, são propostas duas opções ao diagnóstico micológico convencional, exequíveis em laboratórios de nível de biossegurança 2: a realização de testes sorológicos presuntivos, a partir de antígenos extraídos de cepas regionais de *C. posadasii*, e a detecção de seqüências genéticas exclusivas do fungo diretamente em amostra de escarro.

OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Com este estudo, buscou-se analisar as características fenotípicas de *C. posadasii* isoladas no Estado do Ceará e desenvolver métodos independentes de cultivo para o diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose no Nordeste brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

- 1 Determinar as características morfológicas e fisiológicas de cepas de *C. posadasii in vitro*;
- 2 determinar o perfil de sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *C. posadasii* ante a drogas utilizadas no tratamento da coccidioidomicose e a novos antifúngicos com potencial terapêutico;
- 3 avaliar a sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *C. posadasii* diante dos antimicrobianos utilizados no tratamento da tuberculose e leishmaniose;
- 4 padronizar a metodologia de obtenção de antígenos a partir de cepas locais de *C. posadasii* e avaliar a reatividade das preparações antigênicas mediante a técnica de imunodifusão; e
- 5 padronizar metodologia de extração de DNA de culturas de *C. posadasii*, bem como de reação de PCR para diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose diretamente em amostra de escarro.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção das amostras e etapas da pesquisa

A presente pesquisa foi realizada em três etapas: 1) Caracterização fenotípica das cepas de *C. posadasii*; 2) Produção de antígenos específicos a partir de cepas de *C. posadasii* e avaliação do potencial imunodiagnóstico dessas preparações antigênicas; e 3) Padronização de protocolos para identificação laboratorial de *C. posadasii*, por meio de reação de PCR, a partir de culturas filamentosas e escarro.

Para o desenvolvimento das etapas deste trabalho, foram utilizadas 10 cepas de *C. posadasii* isoladas no Estado do Ceará (Quadro 2). As cepas-teste pertencem à Coleção de Culturas do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), registrada no WFCC (*World Federation of Culture Collections*), sob o número 880. As condições de preservação das culturas incluíam ágar batata a 4°C, solução salina tamponada a 4°C e ágar batata a -20 °C. Todas as culturas foram manipuladas no CEMM, sob normas de biossegurança nível 3.

Adicionalmente, foram empregadas 10 amostras de soro de pacientes com coccidioidomicose, 120 amostras de soro de indivíduos saudáveis, além de uma amostra de soro canino, todas pertencentes à Soroteca do Centro Especializado em Micologia Médica (Quadro 3), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Todas as amostras de soro humano foram obtidas após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (processo número: 35/04). Uma amostra de escarro encaminhada para diagnóstico laboratorial de rotina, obtida de paciente com suspeita clínica de coccidioidomicose, foi incluída nesta pesquisa.

Por fim, o presente experimento harmonizou-se aos ditames da Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde do Brasil, que regula pesquisas em seres humanos, compadecendo-se, com efeito, aos referenciais da Bioética, configurados nos aspectos da autonomia, não-maleficência, beneficência, justiça e equidade.

Quadro 2. Relação das cepas de *C. posadasii* utilizadas na pesquisa.

Número de coleção	Procedência (Estado do Ceará)	Isolamento
--------------------------	------------------------------------------	-------------------

CEMM 01-6-085	Santa Quitéria (4°19'55"S - 40°09'24"W)	Clínico – lavado broncoalveolar
CEMM 01-6-087	Catunda (4°38'52"S - 40°12'05"W)	Clínico – lavado broncoalveolar
CEMM 01-6-088	Santa Quitéria	Clínico – lavado broncoalveolar
CEMM 01-6-089	Solonópole (5°44'00"S - 39°00'27"W)	Clínico – lavado broncoalveolar
CEMM 01-6-090	Solonópole	Ambiental – toca de tatu (<i>Dasypus novemcinctus</i>)
CEMM 01-6-091	Solonópole	Ambiental – toca de tatu (<i>Dasypus novemcinctus</i>)
CEMM 01-6-092	Solonópole	Ambiental – toca de tatu (<i>Dasypus novemcinctus</i>)
CEMM 01-6-101	Solonópole	Clínico – lavado broncoalveolar
CEMM 01-6-102	Arneiroz (6°19'25"S - 40°09'38"W)	Clínico – lavado broncoalveolar
CEMM 01-6-103	Aiuaba (6°34'25"S - 40°07'25"W)	Clínico – escarro

Quadro 3. Relação das amostras de soro utilizadas na pesquisa, destacando origem geográfica e quantidade de cada amostra.

Origem do soro	Procedência (Estado do Ceará)	Quantidade
Pacientes com	Arneiroz	1

coccidiodomicose	Catunda	1
	Ibiapina * (3°55'24"S - 40°53'22"W)	1
	Santa Quitéria	1
	Sobral (3°41'10"S - 40°20'59"W)	3
	Solonópole	1
Indivíduos saudáveis	Catunda	60
	Fortaleza * (3°43'02"S - 38°32'35"W)	20
	Santa Quitéria	40
Animal com sintomatologia de coccidiodomicose	Catunda (4°38'52"S - 40°12'05"W)	1

* Área não endêmica para coccidiodomicose

4.2 Etapa I - Caracterização fenotípica

Para a caracterização fenotípica das cepas, foram empregadas as seguintes abordagens:

- (a) análises macro e micromorfológica das colônias em diferentes meios de cultura, após 5 e 20 dias de cultivo;
- (b) análise da cinética de crescimento ante o estresse salino, térmico e de pH;
- (c) avaliação da capacidade de assimilação de várias fontes de carbono e nitrogênio; e
- (d) determinação do perfil de sensibilidade frente a antimicrobianos.

4.2.1 Caracterização macro e micromorfológica das cepas de *C. posadasii*

As características macro e micromorfológicas das cepas foram analisadas nos meios de cultura ágar batata dextrose (Difco, Detroit, EUA), ágar Sabouraud dextrose a 2% (Sanofi, França) e ágar YEG (**Anexo I**). Foi utilizada a metodologia descrita por Brilhante et al. (2004), modificando período de incubação. As cepas foram repicadas em duplicata nos tubos de ensaio contendo cada um dos meios de cultura descritos acima e incubadas a 28 °C. Para a análise macromorfológica, foram registradas as características de relevo, textura e pigmentação das colônias, após 5 e 20 dias de incubação. A análise micromorfológica foi realizada após montagem, entre lâmina e lamínula, de fragmentos de cada colônia com lactofenol azul-algodão (**Anexo I**) e observação em microscópio óptico. Foram

padronizados 10 campos na objetiva 40X e quantificação dos artroconídios de acordo com os seguintes parâmetros: 0 - 10, 10 - 50 ou > 50 células/campo. Após quantificação, pelo menos 20 artroconídios de cada cultura foram mensurados por meio de retículo acoplado a ocular de 10X.

4.2.2 Avaliação da cinética de crescimento

A cinética de crescimento das cepas de *C. posadasii* foi avaliada em diferentes condições de salinidade, temperatura e pH. Cada cepa foi inicialmente repicada em placas de Petri contendo ágar YEG e incubadas a 28°C por 10 dias. Após esse período, a fim de padronizar o tamanho do inóculo fúngico, fragmentos de 7 mm de diâmetro foram removidos da borda das colônias com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril.

A avaliação do crescimento das cepas em diferentes condições de salinidade foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Fisher et al (2002). Cada inóculo, preparado conforme descrito acima, foi transferido para placas de Petri, contendo ágar YEG suplementado com cloreto de sódio em quatro diferentes concentrações: 0,034 M (2%), 0,068 M (4%), 0,102 M (6%) e 0,136 M (8%). As cepas foram testadas em triplicata para cada condição experimental. A fim de minimizar riscos de acidentes, as placas foram vedadas com filme de pvc e mantidas em recipiente de plástico impermeável. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C e, com o auxílio de um paquímetro, foram realizadas medidas do crescimento das colônias após 4, 8, 10 e 14 dias de incubação.

O crescimento das cepas também foi avaliado em triplicata após 4, 8, 10 e 14 dias de incubação em placas de Petri, contendo ágar YEG em diferentes condições de temperatura (10 °C; 20 °C; 30 °C; 40 °C; 50 °C; 60 °C) e pH (4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 11,0).

4.2.3 Testes fisiológicos

A capacidade de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio pelas cepas foi avaliada em meio mineral líquido, destituído de macronutrientes.

Inicialmente, culturas de *C. posadasii* foram removidas do estoque, repicadas em ágar batata e incubadas a 28 °C por 10 dias, para confirmação de viabilidade e pureza das amostras. Após esse período, as culturas foram cobertas com 2 mL de salina estéril (**Anexo I**) e, com auxílio de alça

microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície do micélio, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões foram transferidas para tubos de ensaio estéreis e, em seguida, deixadas em repouso a 28 °C por 15 minutos, a fim de garantir a precipitação das partículas de maior densidade. Após esse intervalo, o sobrenadante obtido foi diluído na proporção de 1:50 em água deionizada estéril. As suspensões foram lidas em espectrofotômetro a 530 nm e a transmitância foi ajustada para 95%. Finalmente, as suspensões foram diluídas novamente na proporção de 1:10 em água deionizada estéril, a fim de se obter um inóculo de aproximadamente 1×10^4 UFC/mL, praticamente livre de nutrientes contaminantes.

A capacidade de assimilação dos diferentes compostos pelas cepas de *C. posadasii* foi avaliada em meios minerais destituídos de qualquer fonte de carbono (**Anexo I**) ou nitrogênio (**Anexo I**).

Os testes de assimilação foram realizados em tubos de ensaio contendo 2 mL do meio mineral suplementado com fonte de carbono (2% p/v) ou nitrogênio (aminoácidos 1% p/v; nitrogênio inorgânico 1% p/v; vitaminas 0,5% p/v). Alíquotas de 100 µl das suspensões fúngicas, preparadas conforme previamente descrito, foram inoculadas em cada tubo e as culturas incubadas em estufa a 35 °C, sendo analisadas após 4 e 10 dias. As cepas foram testadas em triplicata para cada fonte de carbono e nitrogênio avaliadas no experimento. Controles positivos foram confeccionados em meio mineral suplementado com D-glicose e extrato de levedura, como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. O experimento foi analisado tendo como referência a quantidade de crescimento fúngico observada nos controles positivos. Foi utilizado o seguinte critério de escores, proposto por Vastag et al. (1998), para assimilação de fontes de carbono e nitrogênio por cepas de *Rhizomucor* spp.:

(++) crescimento intenso;

(+) crescimento fraco;

(v) crescimento variável*;

* sem uniformidade do resultado de assimilação entre as cepas.

** crescimento fraco ou ausência de crescimento.

Para o controle de qualidade do experimento, foi empregada a cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, a qual foi testada em provas auxonométricas. O quadro 4 apresenta os compostos testados no ensaio de assimilação.

A capacidade de degradação de uréia foi avaliada em ágar de Christensen (**Anexo I**), de acordo com De Hoog et al. (2006). A tolerância a cicloheximida foi avaliada em caldo BHI (Difco, Detroit, USA) nas concentrações 0,01; 0,05; 0,1 e 0,2% (p/v).

Quadro 4. Relação dos compostos testados nos testes de assimilação em meio mineral.

Fontes de Carbono			
D(-)-Arabinose	L(+)-Ramnose	D-Xilose	D-Frutose
D-Galactose	D(+)-Manose	Celobiose	D(+)-Lactose
D(+) Maltose	D-Melibiose	Sacarose	D(+)-Trealose
D(+)-Melezitose	Inulina	Dextrina	Rafinose
Glicerol	Eritritol	Adonitol	D(+)-Arabitol
Dulcitol	Inositol	Manitol	D-Sorbitol
Ácido caféico	Dimetil sulfóxido	Ácido malônico	Fenol
Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
Fontes de carbono e nitrogênio			
Glicina	L-Fenilalanina	L-Triptofano	L-Cisteína
L-Metionina	L-Tirosina	L-Asparagina	L-Arginina
L-Lisina	L-Histidina	L-Ácido aspártico	Ornitina
Tiamina	Ácido nicotínico	Nitrito de sódio	Nitrato de sódio

4.2.4 Teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*

O perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas frente a antifúngicos e drogas antituberculose e antileishmaniose foi determinado em ensaio de macrodiluição, de acordo com o protocolo descrito no documento M38-A, padronizado pelo CLSI (NCCLS, 2002). Foram utilizadas cepas de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6528) como controles de qualidade.

Para a confecção do inóculo, foram preparadas suspensões a partir de culturas mantidas em ágar Sabouraud dextrose a 2%, na temperatura de 28 °C, por 10 dias. Para tanto, as culturas foram cobertas com 2 mL de salina estéril e, com auxílio de alça microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície do micélio, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões foram transferidas para tubos de ensaio estéreis e, em seguida, deixadas em repouso a 28 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 530 nm e a sua transmitância ajustada para 95%. As suspensões contendo artroconídios e fragmentos de hifas foram diluídas na proporção de 1:10 com RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.) tamponado a pH 7,0 com MOPS 0,165 M para obtenção de inóculo de aproximadamente 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL.

Soluções-estoque de anfotericina B, cetoconazol e itraconazol foram preparadas em DMSO; fluconazol, voriconazol e caspofungina foram diluídos em água destilada. As concentrações testadas variaram conforme apresentado no quadro 5. Soluções-estoque de rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) foram preparadas em DMSO e testadas isoladamente ou combinadas (Quadro 6), em diferentes concentrações. Para o antimoniato de meglumina, uma alíquota da solução da droga (300 mg/mL) foi diluída diretamente em meio RPMI. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas dessa solução, as quais apresentaram concentrações que variaram de 0,9 a 15 mg/mL. Todas as soluções foram estocadas a -80°C até a realização do ensaio, quando foram diluídas seriadamente em escala 1:2 em RPMI.

Os testes de sensibilidade aos quimioterápicos retrocitados foram realizados em tubos de polipropileno estéreis, contendo 0,1 mL de cada droga previamente diluída, aos quais se adicionou 0,9 mL do inóculo fúngico preparado conforme descrito acima. Todas as cepas foram avaliadas em duplicata. Para os antifúngicos, as leituras dos resultados foram realizadas visualmente, após incubação dos tubos a 35 °C por 48 horas. Para os quimioterápicos antituberculose e antimoniato de meglumina, as leituras foram realizadas, após incubação dos

tubos a 35 °C, em intervalos de 2, 4 e 7 dias. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida conforme apresentado abaixo:

- caspofungina e azólicos - menor concentração da droga que causa redução de 80% no crescimento fúngico, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga (CLSI, 2002; NAKAI et al., 2003);
- anfotericina B - menor concentração da droga capaz de impedir o crescimento fúngico (CLSI, 2002);
- drogas antituberculose e antileishmaniose - menor concentração da droga que causa redução de 80% no crescimento fúngico, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga.

Quadro 5. Drogas antifúngicas e concentrações testadas na pesquisa.

Drogas	Concentração inicial (µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Anfotericina B	0,007	4,0
Cetoconazol	0,009	5,0
Itraconazol	0,015	8,0
Fluconazol	0,048	25,0
Voriconazol	0,031	4,0
Caspofungina	0,250	128,0

Quadro 6. Concentrações de cada quimioterápico testado isoladamente ou em combinações.

Drogas	Concentração inicial (mg/mL)	Concentração final (mg/mL)
Rifampicina (RIF)	0,016	8,5
Isoniazida (INH)	0,015	8,0
Pirazinamida (PZA)	0,048	25,0
Etambutol (EMB)	0,039	20,0

RIF +	0,002	1,5
PZA	0,024	12,5
EMB +	0,018	10,0
INH	0,009	5,0
RIF +	0,016	8,5
INH +	0,004	2,5
EMB	0,018	10,0
RIF +	0,009	5,0
INH +	0,014	7,5
PZA	0,024	12,5
RIF +	0,008	4,5
INH +	0,012	6,5
PZA +	0,024	12,5
EMB	0,016	8,5

Os dados gerados pelas análises de caracterização morfológica, testes fisiológicos e testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* foram avaliados de forma qualitativa.

O critério de informação de Akaike (AIC) foi utilizado para a escolha da estrutura de covariância que melhor se ajustou aos dados dos testes de avaliação da cinética de crescimento *in vitro* (MONTGOMERY, 1991). As curvas foram ajustadas por intermédio de um polinômio de terceira ordem para cada variável analisada (concentração de NaCl, temperatura e pH).

4.3 Etapa II - Produção de antígenos e testes de reatividade *in vitro*

4.3.1 Produção de antígenos

Protocolos previamente descritos para produção de antígenos de *C. immitis* (COX & BRITT, 1986; YUAN et al.1988; ELIAS COSTA et al., 1995) foram modificados quanto ao meio de cultura empregado, tempo e temperatura de incubação. A partir dessas modificações, foram delineadas três abordagens para a produção de antígenos da cepa CEMM 01-6-085, através de quatro protocolos experimentais.

Inicialmente, culturas de *C. posadasii* foram retiradas do estoque em salina a 4°C, repicadas em ágar batata e incubadas a 28 °C, por 10 dias, para confirmação de viabilidade e pureza das amostras. Após esse período, as culturas foram cobertas com 10 mL de salina estéril e, com auxílio de alça microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície do micélio, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões contendo hifas e artroconídios foram transferidas para frascos com meio de cultura líquido, encerrando 10X o volume do inóculo. Foram testadas três fórmulas para cultivo das cepas de *C. posadasii*, conforme descrito a seguir:

- **meio de cultura I** - glicose 2% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v);
- **meio de cultura II** - glicose 2% (p/v); extrato de levedura 1% (p/v); e
- **meio de cultura III** - glicose 2% (p/v); fosfato de potássio monobásico 0,15% (p/v); sulfato de magnésio 0,05% (p/v); sulfato de amônio 0,2% (p/v); L-asparagina 0,2% (p/v); extrato de levedura 0,1% (p/v).

As culturas foram incubadas de forma estacionária ou sob agitação constante de 50 rpm, a 28 °C, durante diferentes intervalos de tempo: 7, 10, 15, 20 e 30 dias. Ao término de cada período de incubação experimental, cada cultura foi inativada com solução de timerosal (**Anexo I**) na concentração de 0,2 g/L e incubadas em fase estacionária ou sob agitação constante de 50 rpm, a 28 °C. As culturas foram mantidas em contato com timerosal por 24 horas, para obtenção de “exoantígeno” ou por 10 dias, para obtenção de “antígeno celular” e “antígeno total”. A inocuidade das amostras foi avaliada por meio de cultivos em caldo BHI a 35 °C por 10 dias, bem como pelo método de exclusão de *Trian blue* (PHILLIPS, 1973). Fragmentos do micélio fúngico foram misturados ao corante azul de tripan (**Anexo I**), na concentração de 0,4% p/v, montados entre lâmina-lamínula e levados ao microscópio óptico comum para visualização das estruturas não viáveis, as quais aparecem coradas de azul. Após inativação com timerosal, três diferentes abordagens foram utilizadas, conforme delineado na seqüência:

(I) Obtenção do exoantígeno

O exoantígeno foi obtido após filtração de cada cultura e precipitação do filtrado com sulfato de amônio. Para tanto, o filtrado foi transferido para um béquer estéril e submetido à rotação suave em agitador magnético. Pequenas porções de sulfato de amônio sólido foram adicionadas à mistura até que fosse atingido o percentual de 90% de saturação. A quantidade de reagente utilizada foi calculada mediante a fórmula seguinte, descrita por Scopes (1994):

onde

$$g = \frac{535 (S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2}$$

g = grama de sulfato de amônio a ser adicionado a 1 litro da solução

S1 - saturação inicial (%) do sal em solução; e

S2 - saturação final (%) do sal em solução.

Após completa adição do reagente, a mistura foi deixada em repouso a 4 °C por 24 horas, e em seguida centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos. O precipitado obtido foi ressuspenso em solução salina, dialisado exaustivamente contra água destilada em membrana com *cut off* de 10 KDa, liofilizado e estocado a -20 °C.

(II) Obtenção do antígeno celular

Após filtração das culturas inativadas por timerosal por 24 horas, os debris celulares retidos no filtro de papel foram recuperados com o auxílio de uma espátula estéril e transferidos para frascos contendo salina em 1/10 do volume original da cultura. Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 50 rpm, a 28 °C, durante 10 dias. Após esse período, o material foi novamente filtrado em papel de filtro estéril e o filtrado obtido foi precipitado com sulfato de amônio nas mesmas condições descritas acima. O precipitado obtido foi ressuspenso em solução salina, dialisado exaustivamente contra água destilada em membrana com *cut off* de 10 KDa, liofilizado e estocado a -20 °C.

(III) Obtenção do antígeno total

Para obtenção do antígeno total, culturas incubadas com timerosal por 10 dias foram filtradas em papel de filtro e o filtrado obtido foi precipitado com sulfato de amônio nas mesmas condições previamente descritas. O precipitado obtido foi ressuspenso em solução salina, dialisado exaustivamente contra água destilada em membrana com *cut off* de 10 KDa. O dialisado obtido foi estocado sob diferentes condições: 4 °C; -20 °C; -80 °C; e liofilizado a -20 °C.

O quadro 7 apresenta uma descrição detalhada das etapas experimentais de cada protocolo testado.

4.3.2 Determinação da concentração de proteínas

As concentrações protéicas das frações antigênicas foram estimadas pelo Método de Bradford (1976), a partir de curva-padrão com albumina sérica bovina. Os resultados foram determinados em espectrofotômetro, com leitura da absorbância a 490 nm.

4.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético das frações antigênicas imuno-reativas foi determinado em gel de poliacrilamida contendo SDS, de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), com adaptações. Os géis de concentração (**Anexo I**) e separação (**Anexo I**) foram preparados encerrando concentrações finais de 12,5% e 3,75%, respectivamente.

Alíquotas de 100 µl de cada preparação imuno-reativa foram misturadas a igual volume de tampão de amostra (**Anexo I**) contendo SDS e β-mercaptoetanol, ou preparadas na concentração de 2 mg/mL. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos e, em seguida, centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. Alíquotas de 20 µl do sobrenadante obtido foram aplicadas em cada caneta do gel de separação. As corridas eletroforéticas foram conduzidas em voltagem constante de 80 V, por aproximadamente 90 minutos, em tampão de corrida (**Anexo I**) contendo SDS e glicina.

Após a eletroforese, os géis foram fixados em solução álcool-ácida por 2 horas, corados com *coomassie brilliant blue* R-250 (**Anexo I**) por 3 horas e, em seguida, tratados com solução descorante, conforme protocolo descrito por Camargo (2004).

Quadro 7. Resumo das principais etapas empregadas durante o preparo das frações antigênicas

PROCEDIMENTO	Protocolo I	Protocolo II	Protocolo III	Protocolo IV
<i>Etapa I</i>	Meio de cultura I	Meio de cultura II	Meio de cultura II	Meio de cultura III
Cultivo	28 °C, 50 rpm; 7, 10, 15, 20 e 30 dias	28 °C, 50 rpm; 7, 10, 15, 20 e 30 dias	28 °C, 30 dias, forma estacionária	28 °C, 30 dias
<i>Etapa II</i>	28 °C, 50 rpm, 24 horas (“exoantígeno”); 10 dias (“antígeno celular”)	28 °C, 50 rpm, 10 dias	28 °C, 10 dias	28 °C, 10 dias
<i>Etapa III</i>	Papel de filtro	Papel de filtro	Papel de filtro	Papel de filtro
<i>Etapa IV</i>	Filtrado e debris celulares até 90% de saturação	Apenas filtrado até 90% de saturação	Apenas filtrado até 90% de saturação	Apenas filtrado até 90% de saturação
<i>Etapa V</i>	10.000 x g por 30 minutos; descarte do sobrenadante	10.000 x g por 30 minutos; descarte do sobrenadante	10.000 x g por 30 minutos; descarte do sobrenadante	10.000 x g por 30 minutos; descarte do sobrenadante
<i>Etapa VI</i>	Água destilada; membrana com <i>cut off</i> de 10 KDa.	Água destilada; membrana com <i>cut off</i> de 10 KDa.	Água destilada; membrana com <i>cut off</i> de 10 KDa.	Água destilada; membrana com <i>cut off</i> de 10 KDa.
<i>Etapa VII</i>	Liofilizado a -20 °C	Liofilizado a -20 °C	4 °C; -20°C ; -80 °C; Liofilizado a -20°C	4 °C; -20°C ; -80 °C; Liofilizado a -20 °C

4.3.4 Imunodifusão radial dupla (Ouchterlony)

A reatividade das preparações antigênicas foi testada mediante a técnica de Imunodifusão radial dupla (Ouchterlony), conforme protocolo descrito por Camargo (2004). Sobre lâminas de vidro (25 x 75mm) foram preparados géis de agarose 1% (p/v) com 7 perfurações (1 central e 6 periféricas equidistantes). Cada preparação antigênica foi testada em géis individuais, mediante inoculação de 20 µl no orifício central e adição de soro-controle nos demais orifícios. Soro humano, positivo para coccidioidomicose (Immy Imunodiagnosics, EUA), foi utilizado como controle para as reações de imunodifusão. Após incubação em câmara úmida por aproximadamente 18 horas, os géis foram lavados por 1 hora em solução de citrato de sódio (**Anexo I**) e, em seguida, incubados em solução salina por 24 horas, com trocas a cada 6 horas. Após secagem dos géis com papel de filtro, as linhas de precipitação foram visualizadas após coloração com *coomassie brilliant blue R* (**Anexo I**), seguida de descoloração com solução descorante.

4.3.5 Reatividade das preparações antigênicas ante amostras de soro humano

Após padronização da técnica de Imunodifusão radial dupla, as preparações antigênicas foram testadas ante 7 amostras de soros de pacientes com coccidioidomicose pulmonar, bem como 120 amostras de soro de indivíduos saudáveis. Soro humano positivo para coccidioidomicose e antígeno de *C. immitis* IDCF (Immy Imunodiagnosics, EUA) foram utilizados como controles para as reações de imunodifusão. O controle negativo foi confeccionado com solução salina ou amostras dos meios de cultura utilizados para o cultivo do fungo, consoante descrito no item **4.3.1**.

Os dados gerados pela produção de antígenos de *C. posadasii* e determinação da reatividade das preparações antigênicas *in vitro* foram avaliados de forma qualitativa.

4.4 Etapa III - Diagnóstico molecular

4.4.1 Extração de DNA de culturas de *C. posadasii*

Inicialmente, as culturas fúngicas puras foram repicadas em caldo BHI e incubadas sob agitação constante de 50 rpm a 37 °C por 5 dias. Após esse período, as culturas foram inativadas por calor úmido em autoclave (1 atm, 100 °C) por 15 minutos. A viabilidade das amostras foi analisada após repique de fragmentos da massa miceliana em ágar batata e incubação a 28 °C por 7 dias. Todo o material autoclavado foi estocado em *freezer* a -20 °C até a confirmação da ausência de crescimento fúngico nas condições descritas há pouco, a fim de garantir a inocuidade das amostras para extração de DNA.

Após confirmação da inativação das culturas, as amostras foram descongeladas e, em seguida, lavadas com solução salina para remoção do meio de cultura e metabólitos extracelulares. A massa miceliana de cada amostra foi tratada com 100 µl de liticase (3 mg/mL em solução salina) e incubada a 37 °C por 3 horas.

Foram testados três protocolos para a extração de DNA de culturas de *C. posadasii*, delineados a partir de modificações das metodologias previamente descritas por Talbot (2001), para fungos filamentosos, e Burt et al. (1995), para *C. immitis*. Foram modificadas as condições de crescimento do fungo, bem como as soluções empregadas para a lise celular.

No primeiro protocolo de extração de DNA (Protocolo A), cada amostra previamente tratada com a enzima liticase foi incubada com tampão CTAB (**Anexo I**) na proporção 1:10 (v/v) e incubada sob agitação a 70 rpm por um período de aproximadamente 12 horas a 56 °C. Após esse período, as amostras foram misturadas, em volumes iguais, a solução de clorofórmio e álcool iso-amilico (24:1 v/v) e centrifugadas a 5000 x g por 15 minutos. O sobrenadante obtido de cada amostra foi transferido para tubos de polipropileno estéreis e misturados a isopropanol (2/3 do volume da amostra). Cada mistura foi incubada a -20°C, por aproximadamente 12 horas e, em seguida, centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e etanol 100% e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. O DNA precipitado e seco de cada amostra foi dissolvido em água destilada ultrapura e estocado a -20°C.

No segundo protocolo de extração de DNA (Protocolo B), após tratamento enzimático, cada amostra foi ressuspensa em 1 mL do tampão de lise contendo triton (**Anexo I**) e em seguida, submetida a três ciclos alternados de aquecimento a 100 °C e resfriamento a -80 °C, durante 10 minutos. Após o último ciclo, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante obtido foi estocado a -20°C.

No terceiro protocolo de extração de DNA (Protocolo C), foram utilizadas culturas em fase filamentosa e mantidas em ágar Sabouraud dextrose a 2%, na temperatura de 28 °C, por 10 dias. Cada cultura foi coberta com 5 mL de salina estéril e, auxílio de alça microbiológica, foram realizadas raspagens da superfície do micélio, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos do meio de cultura. As suspensões obtidas foram transferidas para tubos de ensaio e inativadas por calor úmido em autoclave (1 atm, 100 °C) por 15 minutos. Após confirmação da inativação das amostras, conforme descrito há instantes, o material foi descongelado e centrifugado a 5000 x g por 10 minutos. O precipitado obtido foi tratado com 100 µl de liticase (3 mg/mL em solução salina) e incubado a 37 °C por 3 horas. Após esse período, as amostras foram tratadas com tampão de lise contendo triton e submetidas a choque térmico, de acordo com o protocolo retrocitado.

A integridade das amostras foi avaliada mediante eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA - TBE 1X (**Anexo I**). Alíquotas de 5 µl de cada amostra foram misturadas a 1 µl de tampão de amostra (**Anexo I**) e, em seguida, aplicadas em cada canaleta do gel. Após migração a 100V por 1 hora, o gel foi corado com brometo de etídio por 10 minutos sob agitação suave e, em seguida, irradiado com luz ultravioleta em transluminador.

4.4.2 Extração do DNA de *C. posadasii* em amostra de escarro

Foi realizada a extração do DNA de *C. posadasii* presente em uma amostra de escarro obtida de paciente com suspeita clínica de coccidioidomicose pulmonar. A amostra foi encaminhada ao CEMM para pesquisa direta em microscópio óptico e cultura nos meios ágar Sabouraud dextrose a 2%, ágar Sabouraud com cloranfenicol (0,05 mg/mL) e ágar Mycosel (Sanofi, França). O diagnóstico micológico revelou a presença de esférulas sugestivas de *Coccidioides* spp., as quais mostraram tamanho variável entre 10 e 60 µm, paredes grossas e birrefringentes, contendo endósporos em seu interior. A amostra, no entanto, foi considerada

inadequada para cultivo micológico, uma vez que apresentou grande quantidade de células epiteliais e poucos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (Figura 11).

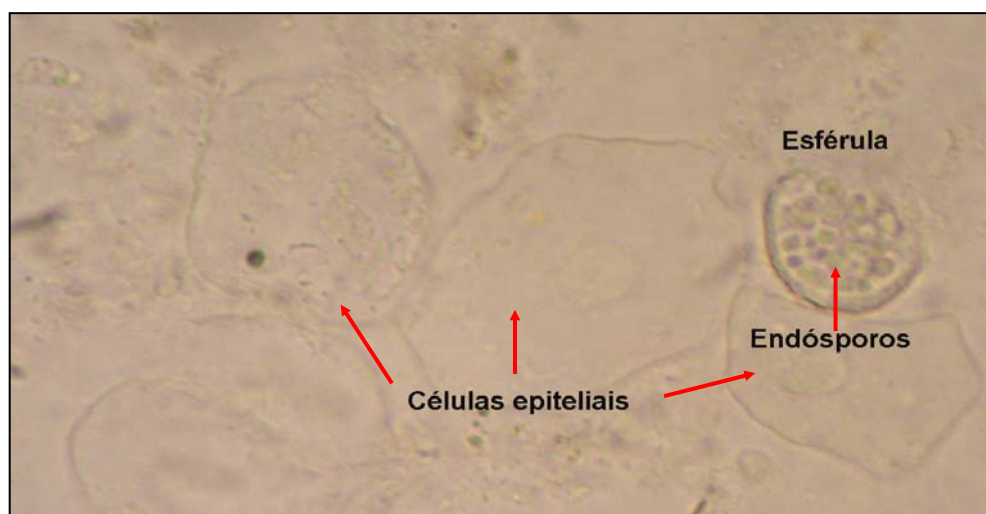


Figura 11 – Exame direto, em KOH a 30%, de escarro impróprio para cultura, apresentando esférula sugestiva de *C. posadasii* e numerosas células epiteliais.

Para a extração de DNA, foi utilizado protocolo adaptado de Aldous et al. (2005), originalmente descrito para *Mycobacterium tuberculosis*. Inicialmente, uma alíquota de 1 mL de amostra de escarro foi transferida para um microtubo estéril, misturada a 200 µl de NaOH 5% e incubada em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 14,000 x g por 5 minutos e o precipitado obtido foi lavado duas vezes com tampão PBS (**Anexo I**). Em seguida, as células foram misturadas a 100 µl de liticase (3 mg/mL) e incubadas a 37 °C por 2 horas. A mistura foi tratada com tampão de lise (**Anexo I**) contendo proteinase K (150 µg/mL) e incubada a 56 °C por 1 hora. As células lisadas foram centrifugadas a 8,000 x g por 15 segundos e o sobrenadante obtido foi estocado a -20 °C, sendo posteriormente testado em reações de PCR.

A fim de avaliar a segurança do protocolo de extração de DNA, uma alíquota de 100 µl do lisado celular obtido, conforme descrito há pouco, foi transferida assepticamente para tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo BHI e incubada a 37 °C por 20 dias. A ausência de crescimento fúngico após esse período foi utilizada como critério para garantir a biossegurança do protocolo testado.

4.4.3. Quantificação de DNA

As amostras de DNA foram quantificadas por intermédio de espectrofotometria, a partir de leituras a 260 nm. O cálculo da concentração de DNA de cada amostra foi realizado mediante a seguinte fórmula (SAMBROOK et al., 1989):

$$C \text{ [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times \text{diluição} \times \varepsilon,$$

onde

A_{260} : absorvância a 260 nm;

diluição: fator de diluição da amostra; e

ε : coeficiente de extinção, equivalente a 50 para moléculas de DNA fita dupla.

4.4.4 Ensaio de *nested* PCR

A amplificação de uma seqüência do gene “antigen 2/proline-rich antigen gene” (Ag2/PRA), específica para *C. posadasii*, foi realizada em ensaio de *nested* PCR, de acordo com metodologia descrita por Bialek et al (2004), após ajustes no volume final e concentração dos componentes das reações.

A primeira reação de amplificação foi realizada em volume de 25 μ l contendo 10 μ l de cada amostra-teste, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 1,25 mM de dNTPs, 2 pmol dos *primers* externos Cocci I (5'-GTA CTA TTA GGG AGG ATA ATC GTT-3') e Cocci II (5'-GGT GTC AAC TGG TGG GAT GTC AAT-3') e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega,EUA). Foram empregados os seguintes parâmetros para amplificação:

- 1 desnaturação inicial - 94 °C, 5 minutos;
- 2 desnaturação - 94 °C, 30 segundos;
- 3 anelamento - 50 °C, 30 segundos;
- 4 extensão - 72 °C, 1 minuto;
- 5 repetição das etapas (2), (3), (4) 35 vezes; e
- 6 extensão final - 72 °C, 5 minutos.

A reação de *nested* PCR foi realizada em volume final de 25 μ l contendo 1 μ l do produto obtido na primeira amplificação, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM

MgCl₂, 1,25 mM de dNTPs, 2 pmol dos *primers* internos Cocci III (5'-ATC CCA CCT TGC GCT GTA TGT TCG A-3') e Cocci IV (5'-GGA GAC GGC TGG ATT TTT TAA CAT G-3') e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega). A amplificação foi realizada conforme descrito:

- 1 desnaturação inicial - 94 °C, 5 minutos;
- 2 desnaturação - 94 °C, 30 segundos;
- 3 anelamento - 60 °C, 30 segundos;
- 4 extensão - 72 °C, 1 minuto;
- 5 repetição das etapas (2), (3), (4) 30 vezes; e
- 6 extensão final -72 °C, 5 minutos.

4.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos obtidos pelas reações de *nested* PCR foram analisados em géis de poliacrilamida a 6% (**Anexo I**) em TBE 1X. Alíquotas de 3 µl de cada “amplicon” foram adicionados a 1,5 µl de tampão de amostra 6X e submetidos a eletroforese a 100 V por aproximadamente 1 hora ou até que o corante xileno cianol, presente no tampão de amostra, atingisse a distância aproximada de 1 cm da extremidade inferior do gel. Utilizou-se o padrão DNA 100 pb (Quiagen, Alemanha) como marcador de peso molecular.

A visualização do material separado por eletroforese foi realizada de acordo com o método descrito por Sanguinetti et al. (1994) (**Anexo I**). Os géis foram transferidos para cubas de vidro e mergulhados em solução fixadora por 5 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução oxidante, a qual ficou em contato com os géis por 10 minutos. Após esse período, os géis foram lavados rapidamente com água Mili-Q e transferidos para solução reveladora até visualização das bandas. A coloração foi interrompida após lavagem dos géis em água Mili-Q e solução fixadora.

Os dados obtidos pela extração e quantificação de DNA, bem como pelas reações de *nested* PCR, foram avaliados de forma qualitativa.

5 RESULTADOS

5.1 Etapa I - Caracterização fenotípica

5.1.1 Caracterização macro e micromorfológica

A partir da análise macromorfológica das 10 cepas de *C. posadasii* mantidas em ágar batata, ágar Sabouraud dextrose a 2% e ágar YEG, foram identificadas as seguintes variedades de colônias: tipo I (relevo apiculado, textura glabrosa, cor branca); tipo II (relevo apiculado, textura veludosa, cor branca ou creme) e tipo III (relevo apiculado, textura algodosa, cor branca, creme ou cinza), conforme demonstrado na figura 12.

As colônias do tipo I foram observadas apenas até o quinto dia de incubação, independentemente do meio de cultura testado. Após 20 dias de cultivo, todas as colônias exibiram tipo II ou tipo III, conforme demonstrado na tabela 1.

A menor quantificação de artroconídios foi observada em culturas jovens (cinco dias), independentemente do meio de cultura empregado, tendo sido observadas até 10 células por campo. Após 20 dias de crescimento, apenas duas cepas, mantidas em ágar batata, apresentaram a escala de 0-10 artroconídios por campo. As demais culturas mostraram quantificações entre 10-50 ou >50 artroconídios por campo (Tabela 2).

Foi observado que a dimensão dos artroconídios aumentou ao longo do tempo, variando de 5,0 a 7,5 μm e de 2,5 a 5,0 μm para o tamanho e largura, respectivamente, independentemente do meio de cultura empregado (Tabela 2). A mensuração dos artroconídios de *C. posadasii* está ilustrada na figura 13.



Figura 12. Análise macromorfológica de cepas de *C. posadasii*. A: colônia do tipo I (relevo apiculado, textura glabrosa, cor branca); B: colônia do tipo II (relevo apiculado, textura veludosa, cor branca ou creme); C: colônia do tipo III (relevo apiculado, textura algodosa, cor branca, creme ou cinza).

Tabela 1. Análise macromorfológica de cepas de *C. posadasii* após 5 e 20 dias de cultivo a 28 °C em ágar batata, ágar Sabouraud dextrose a 2% e ágar YEG.

Cepa	Macromorfologia					
	Ágar batata		Ágar Sabouraud		Ágar YEG	
	<i>5 dias</i>	<i>20 dias</i>	<i>5 dias</i>	<i>20 dias</i>	<i>5 dias</i>	<i>20 dias</i>
CEMM 01-6-085	I	II	I	III	II	III
CEMM 01-6-087	I	III	I	III	II	III
CEMM 01-6-088	I	III	II	III	I	III
CEMM 01-6-089	I	II	I	II	I	II
CEMM 01-6-090	I	II	I	III	I	III
CEMM 01-6-091	I	II	I	III	I	III
CEMM 01-6-092	I	III	II	III	I	III
CEMM 01-6-101	I	III	I	III	I	II
CEMM 01-6-102	I	II	II	II	II	II
CEMM 01-6-103	I	III	II	III	I	II

I: colônias com relevo apiculado, textura glabrosa, cor branca; II: colônias com relevo apiculado, textura veludosa, cor branca ou creme; III: colônias com relevo apiculado, textura algodonosa, cor branca, creme ou cinza.

Tabela 2. Análise micromorfológica de *C. posadasii* após 5 e 20 dias a 28 °C, em ágar batata, ágar Sabouraud dextrose a 2% e ágar YEG.

Cepa	Quantidade de artroconídios*						Tamanho dos artroconídios**					
	Ágar batata		Ágar Sabouraud		Ágar YEG		Ágar batata		Ágar Sabouraud		Ágar YEG	
	5 dias	20 dias	5 dias	20 dias	5 dias	20 dias	5 dias	20 dias	5 dias	20 dias	5 dias	20 dias
CEMM 01-6-085	0-10	>50	0	>50	0	>50	5,0/2,5	7,5/5,0	0/0	7,5/5,0	0/0	7,5/5,0
CEMM 01-6-087	0-10	>50	0	>50	0-10	>50	5,0/2,5	7,5/5,0	0/0	7,5/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0
CEMM 01-6-088	0-10	>50	0-10	>50	0-10	>50	5,0/2,5	5,0/5,0	5,0/2,5	5,0/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0
CEMM 01-6-089	0	0-10	0-10	10-50	0-10	10-50	0/0	5,0/2,5	5,0/2,5	5,0/2,5	5,0/2,5	5,0/5,0
CEMM 01-6-090	0-10	>50	0	>50	0-10	>50	5,0/2,5	7,5/5,0	0/0	7,5/5,0	5,0/2,5	5,0/5,0
CEMM 01-6-091	0-10	0-10	0-10	>50	0	10-50	5,0/2,5	5,0/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0	0/0	5,0/2,5
CEMM 01-6-092	0-10	>50	0-10	>50	0-10	10-50	5,0/2,5	5,0/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0	5,0/2,5	5,0/5,0
CEMM 01-6-101	0-10	>50	0-10	>50	0-10	10-50	5,0/2,5	7,5/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0
CEMM 01-6-102	0-10	10-50	0-10	10-50	0-10	10-50	5,0/2,5	5,0/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0
CEMM 01-6-103	0-10	>50	0-10	>50	0-10	>50	5,0/2,5	5,0/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0	5,0/2,5	7,5/5,0

*Média do número de artroconídios observados em 10 campos na objetiva de 40X

** Comprimento / largura, em μm

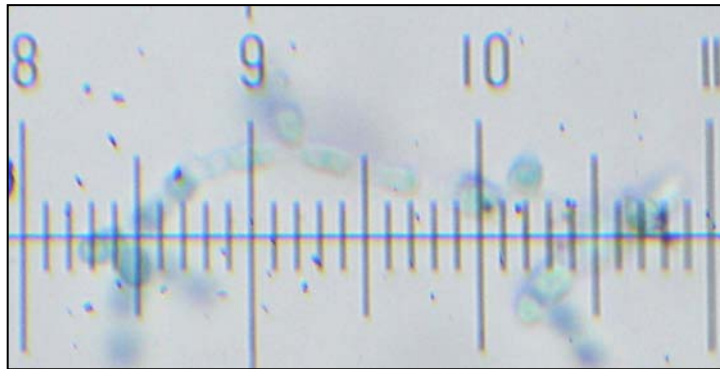


Figura 13. Arthroconídios de *C. posadasii*, mensurados por meio de retículo micrométrico acoplado a ocular de 10X . Imagem obtida em objetiva de 40X.

5.1.2 Avaliação da cinética de crescimento *in vitro*

A análise da cinética de crescimento em ágar YEG suplementado com NaCl revelou que o crescimento médio das cepas de *C. posadasii* é influenciado pela concentração salina no meio de cultura (Figura 14). O aumento da concentração de NaCl causou a redução do crescimento médio das cepas avaliadas. Todas as cepas apresentaram taxa de crescimento relativo máximo em meio YEG suplementado com NaCl a 2% e menor taxa de crescimento em meio com NaCl a 8% ($p < 0,05$).

Quanto à temperatura de incubação, foi observado que as cepas apresentaram taxa de crescimento relativo máximo a 30 °C ($p < 0,05$). Dentre as temperaturas testadas, a menor taxa de crescimento foi observada a 20 °C ($p < 0,05$) e a maior temperatura capaz de permitir a viabilidade das cepas foi 40 °C (Figura 15). Todas as cepas testadas foram incapazes de crescer quando incubadas nas temperaturas 10, 50 e 60 °C.

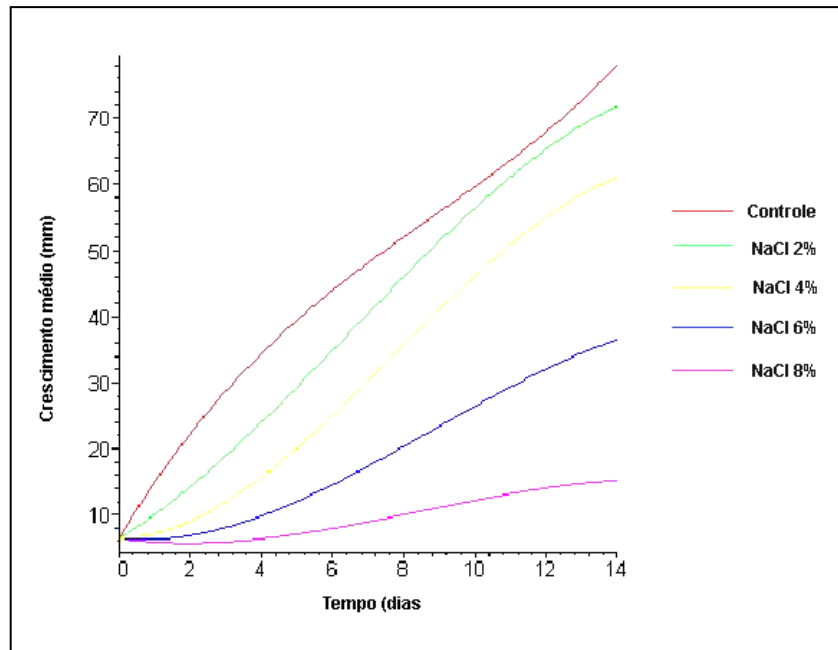


Figura 14. Curvas ajustadas do crescimento médio das cepas de *C. posadasii* em ágar YEG suplementado com 2, 4, 6 ou 8% de NaCl.

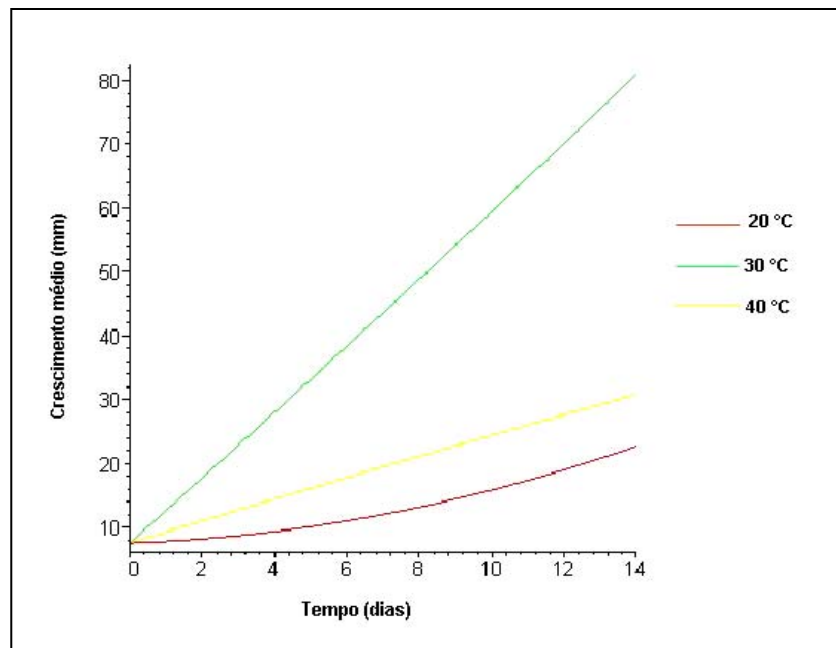


Figura 15. Curvas ajustadas do crescimento médio das cepas de *C. posadasii* em ágar YEG a 20, 30 ou 40 °C.

Todas as cepas de *C. posadasii* avaliadas nesta pesquisa mostraram tolerância à variação de pH, não exibindo diferenças nas taxas de crescimento em meios YEG ajustado aos valores de pH 4, 6, 8, 10 e 11, conforme mostrado na figura 16.

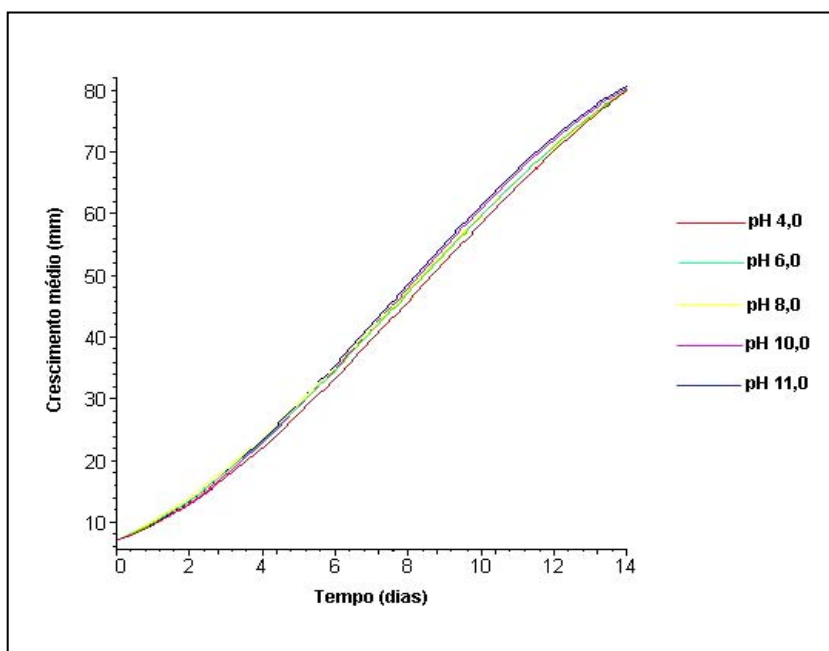


Figura 16. Curvas ajustadas do crescimento médio das cepas de *C. posadasii* em ágar YEG ajustado aos valores de pH 4, 6, 8, 10, 11.

5.1.3 Testes fisiológicos

A análise nutricional demonstrou que vários compostos, apresentados na tabela 3, foram eficientemente assimilados pelas cepas de *C. posadasii* em fase filamentosa. Dentre as 24 fontes de carboidrato avaliadas, as cepas de *C. posadasii* não assimilaram apenas D-xilose e rafinose. As cepas exibiram pouco crescimento na presença de glicerol ou eritritol e foram inibidas quando incubadas em ácido caféico ou fenol. Para exemplificar, a figura 17 ilustra a resposta fisiológica da cepa CEMM 01-6-085, quando incubada em meio mineral suplementado com D-frutose, ácido caféico ou fenol.

Foi observada grande variação na resposta fisiológica, quando aminoácidos foram usados como fontes de carbono e nitrogênio. As cepas apresentaram pouco crescimento na presença de L-fenilalanina, L-metionina ou L-cisteína e foram inibidas na presença de L-ácido aspártico, ácido nicotínico e L-histidina (Tabela 3).

A capacidade de crescimento *in vitro* das cepas de *C. posadasii* foi influenciada pela presença de detergentes não iônicos do tipo polisorbato, conhecidos por “tween”. Apenas o detergente Tween 20 foi utilizado como fonte de carbono pelas cepas de *C. posadasii*, as quais foram totalmente inibidas pelos detergentes Tween 60 e Tween 80.

Todas as cepas estudadas foram positivas para o teste de produção da enzima urease, tendo sido observada a alteração na coloração do meio uréia de Christensen, de amarelo para róseo, após três dias de incubação (Figura 18). As cepas demonstraram crescimento intenso em meio BHI suplementado com cicloheximida a 0,01 e 0,05 %, mas não conseguiram crescer em meios contendo 0,1 e 0,2% desse composto.

Tabela 3. Perfil de assimilação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio por cepas de *C. posadasii*.

Composto	Crescimento
Pentose	
D(-)-arabinose / L(+)-ramnose	(++)
D-xilose	(×)
Hexose	
D-frutose / D-galactose / D(+)-manose	(++)
Dissacarídeo	
Celobiose / D(+)-lactose / D(+)-maltose	(++)
D-melibiose / sacarose	(++)
Oligossacarídeo	
D(+)-trealose / D(+)-melezitose	(++)
Inulina / dextrina	(++)
Rafinose	(v)
Polialcool	
Glicerol	(+)
Eritritol	(×)
Adonitol / D(+)-arabitol / dulcitol	(++)
Inositol / manitol / D-sorbitol	(++)
Aminoácido	
Glicina / L-triptofano	(++)
L-fenilalanina / L-metionina	(+)
L-cisteína / L-histidina	(×)
L-tirosina / L-asparagina / L-arginina	(++)
L-lisina / L-ornitina	(++)
L-ácido aspártico	(-)
Vitaminas	
Tiamina	(++)
Ácido nicotínico	(-)
Tween	
Tween 20	(++)
Tween 40	(v)
Tween 60 / Tween 80	(-)
Outros	
Ácido caféico	(-)
Dimetil sufóxido / ácido malônico	(++)
Nitrito	(++)
Fenol	(-)
Controles	
D-glucose / extrato de levedura	(++)

(++) crescimento intenso; (+) crescimento fraco; (v) crescimento variável (sem uniformidade do resultado entre as cepas); (-) ausência de crescimento; e (×) resultado ambíguo (crescimento fraco ou ausência de crescimento).

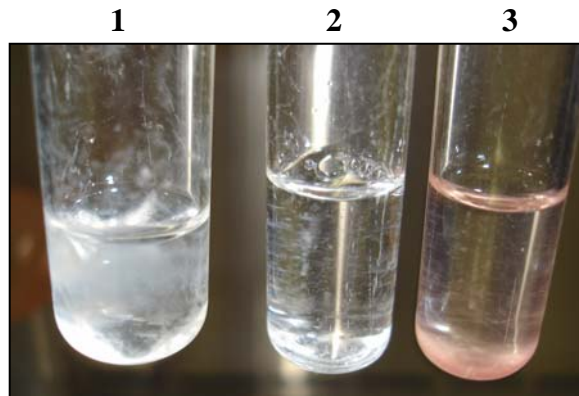


Figura 17. Perfil de assimilação de *C. posadasii* (CEMM 01-6-085) ante D-frutose (1), Tween 80 (2) e fenol (3).



Figura 18. Visualização do teste de produção da enzima urease por *C. posadasii* (CEMM 01-6-085) em meio uréia de Christensen, demonstrando a hidrólise da uréia e mudança do indicador de pH de amarelo para róseo.

5.1.4 Testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*

Todas as cepas de *C. posadasii* foram sensíveis às drogas antifúngicas avaliadas (Tabela 4). Não foram observadas diferenças nos valores de CIM entre as cepas de origem clínica e ambiental. Após 48 horas de incubação, a concentração inibitória mínima mostrou a seguinte variação: **caspofungina** - 16 a 32 $\mu\text{g/ml}$ (média 22,62 $\mu\text{g/mL}$); **anfotericina B** -

0,0625 a 0,125 µg/ml (média 0,116 µg/mL); **cetoconazol** - 0,039 a 0,156 µg/ml (média 0,11 µg/mL); **itraconazol** - 0,125 a 0,5 µg/ml (média 0,153 µg/mL); **fluconazol** - 3,125 a 6,25 µg/ml (média 4,44 µg/mL) e **voriconazol** - 0,125 µg/mL. A figura 19 ilustra o resultado do teste de macrodiluição para a droga anfotericina B, demonstrando a leitura da concentração inibitória mínima para essa droga.

No tocante às drogas antituberculose, foi observado que, à exceção da pirazinamida, todas as demais alteraram o crescimento das cepas de *C. posadasii in vitro* (Tabela 5). Após 48 horas de incubação, a concentração inibitória mínima mostrou a seguinte variação: **rifampicina** - 1,06 a 4,25 mg/mL (média 2,27 mg/mL); **isoniazida** < 0,25 mg/mL e **etambutol** < 0,62 mg/mL. Foram observados valores crescentes da CIM para rifampicina, isoniazida e etambutol, após 2, 4 e 7 dias de incubação.

Combinações formadas pelos quimioterápicos antituberculose mostraram efeito inibitório sobre o crescimento das cepas de *C. posadasii in vitro* (Figura 20). Todas as cepas mostraram-se resistentes apenas à combinação formada pelos fármacos rifampicina e pirazinamida, a qual foi incapaz de inibir o crescimento fúngico, mesmo em concentrações elevadas (rifampicina: 1,5 mg/mL, pirazinamida: 12,5 mg/mL). Após 48 horas de incubação, todas as cepas de *C. posadasii* foram inibidas pelas seguintes concentrações: **etambutol** [0,15 mg/mL] + **isoniazida** [0,07 mg/mL]; **rifampicina** [0,26 mg/mL] + **isoniazida** [0,07 mg/mL] + **etambutol** [0,15 mg/mL]; **rifampicina** [0,31 mg/mL] + **isoniazida** [0,46 mg/mL] + **pirazinamida** [0,78 mg/mL] e **rifampicina** [0,28 mg/mL] + **isoniazida** [0,40 mg/mL] + **pirazinamida** [0,78 mg/mL] + **etambutol** [0,53 mg/mL]. Foram observados valores crescentes da CIM para todas as combinações das drogas antituberculose, após 2, 4 e 7 dias de incubação, conforme apresentado na figura 20.

Todas as cepas de *C. posadasii* mostraram-se resistentes, *in vitro*, ao antimoniato de meglumina nas condições testadas.

Tabela 4. Perfil de sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *C. posadasii* perante as drogas antifúngicas.

Cepa	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)					
	CAS	AMB	CET	ITR	FLU	VRZ
CEMM 01-6-085	32	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125
CEMM 01-6-087	16	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125
CEMM 01-6-088	16	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125
CEMM 01-6-089	32	0,125	0,078	0,125	3,125	0,125
CEMM 01-6-090	32	0,125	0,039	0,25	6,25	0,125
CEMM 01-6-091	16	0,125	0,156	0,125	3,125	0,125
CEMM 01-6-092	16	0,125	0,078	0,125	6,25	0,125
CEMM 01-6-101	32	0,0625	0,078	0,125	6,25	0,125
CEMM 01-6-102	16	0,125	0,156	0,125	6,25	0,125
CEMM 01-6-103	32	0,125	0,156	0,5	6,25	0,125
Média geométrica	22,627	0,116	0,220	0,153	4,440	0,125
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	0,5	1	0,125	0,5	1	0,03
<i>C. krusei</i> (ATCC 6528)	0,25	1	0,25	0,5	64	0,12

CAS: caspofungina; **AMB:** anfotericina; **CET:** cetoconazol; **ITR:** itraconazol;
FLU: fluconazol; **VRZ:** voriconazol

Tabela 5. Perfil de sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *C. posadasii* frente a drogas anti-tuberculose.

Cepa	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)								
	Rifampicina			Isoniazida			Etambutol		
	2 dias	4 dias	7 dias	2 dias	4 dias	7 dias	2 dias	4 dias	7 dias
CEMM 01-6-085	2120	4250	≥8500	<250	<250	500	<620	1250	2500
CEMM 01-6-087	2120	4250	≥8500	<250	<250	500	<620	1250	2500
CEMM 01-6-088	4250	8500	≥8500	<250	<250	500	<620	1250	2500
CEMM 01-6-089	4250	8500	≥8500	<250	<250	500	<620	1250	2500
CEMM 01-6-090	2120	8500	≥8500	<250	<250	500	<620	1250	2500
CEMM 01-6-091	4250	4250	≥8500	<250	<250	500	<620	2500	2500
CEMM 01-6-092	1060	4250	≥8500	<250	<250	500	<620	2500	2500
CEMM 01-6-101	2120	4250	≥8500	<250	<250	500	<620	2500	2500
CEMM 01-6-102	2120	8500	≥8500	<250	<250	500	<620	2500	2500
CEMM 01-6-103	1060	4250	≥8500	<250	<250	500	<620	1250	2500
Média Geométrica	2273	5607	8500	250	250	500	620	1649	2500



Figura 19. Leitura do ensaio de macrodiluição. Os números correspondem a concentrações decrescentes de anfotericina B, obtidas após diluição seriada em escala 1:2. O tubo número 4 ilustra a parada do crescimento de *C. posadasii*, correspondendo a concentração inibitória mínima para essa droga.

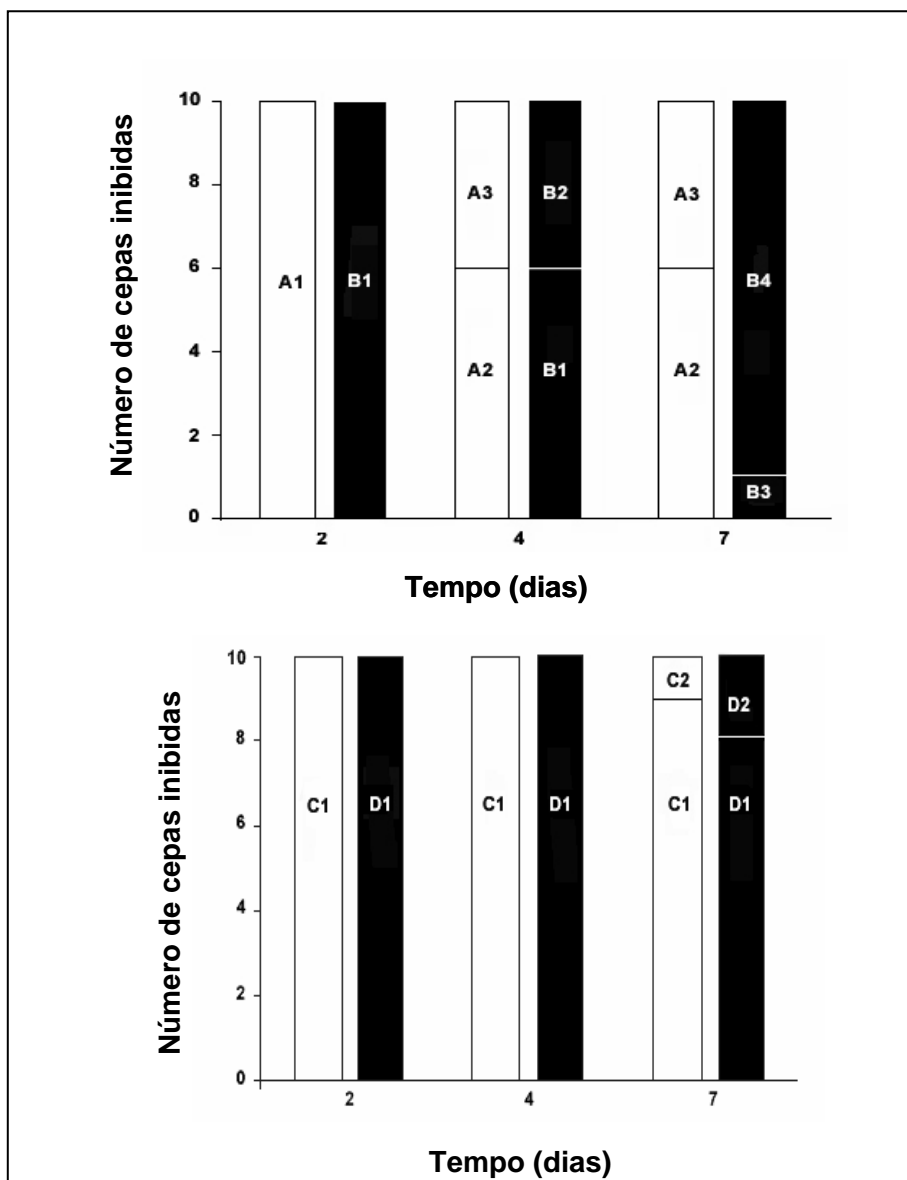


Figura 20. Perfil de sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *C. posadasii* frente a drogas antituberculose combinadas. INH, isoniazida; EMB, etambutol; RIF, rifampicina; PZA: pirazinamida. A1: INH [0.15 mg/mL] +EMB [0.07 mg/mL]; A2: INH [0.31 mg/mL] +EMB [0.15 mg/mL]; A3: INH [0.62 mg/mL] +EMB [0.31 mg/mL]; B1: RIF [0.26 mg/mL] +INH [0.07 mg/mL] +EMB [0.31 mg/mL]; B2: RIF [0.52 mg/mL] +INH [0.15 mg/mL] +EMB [0.62 mg/mL]; B3: RIF [2.08 mg/mL] +INH [0.6 mg/mL] +EMB [2.48 mg/mL]; B4: RIF [4.16 mg/mL] +INH [1.2 mg/mL] +EMB [4.96 mg/mL]; C1: RIF [0.31 mg/mL] +INH [0.46 mg/mL] +PZA [0.78 mg/mL]; C2: RIF [0.62 mg/mL] +INH [0.93 mg/mL] +PZA [1.56 mg/mL]; D1: RIF [0.28 mg/mL] +INH [0.40 mg/mL] +PZA [0.78 mg/mL] +EMB [0.53 mg/mL]; D2: RIF [0.56 mg/mL] +INH [0.81 mg/mL] +PZA [1.56 mg/mL] +EMB [1.06 mg/mL].

5.2 Etapa II - Produção de antígenos e testes de reatividade *in vitro*

5.2.1 Produção de antígenos

Diferentes condições de cultivo foram testadas para obtenção de antígenos de *C. posadasii*. Apesar de não ter sido realizada quantificação de biomassa, foi observado que os três meios de cultura e as condições de incubação testadas permitiram crescimento abundante da massa miceliana. Maiores rendimentos (mg de material / litro de cultura) foram obtidos nos cultivos fúngicos mantidos por 30 dias. O rendimento protéico de cada preparação obtida mostrou-se variável quanto ao protocolo empregado, conforme apresentado na tabela 6.

Tabela 6. Rendimento protéico (g/mL) das preparações antigênicas obtidas com a cepa CEMM 01-6-085, após 30 dias de cultivo.

Protocolo I		Protocolo II	Protocolo III	Protocolo IV
<i>Exoantígeno</i>	<i>Antígeno celular</i>	<i>Antígeno total</i>	<i>Antígeno total</i>	<i>Antígeno total</i>
0,16	0,05	0,56	0,40	0,01

5.2.2 Perfil eletroforético das preparações antigênicas em SDS-PAGE

O perfil eletroforético das preparações antigênicas em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS revelou a presença de várias bandas protéicas com diferentes pesos moleculares, variando aproximadamente de 150kDa a 20kDa (Figura 21). Em decorrência da reduzida quantidade de proteínas obtidas por meio do Protocolo IV, não foi possível visualizar o seu perfil eletroforético por intermédio da coloração com *coomassie brilliant blue R-250*.

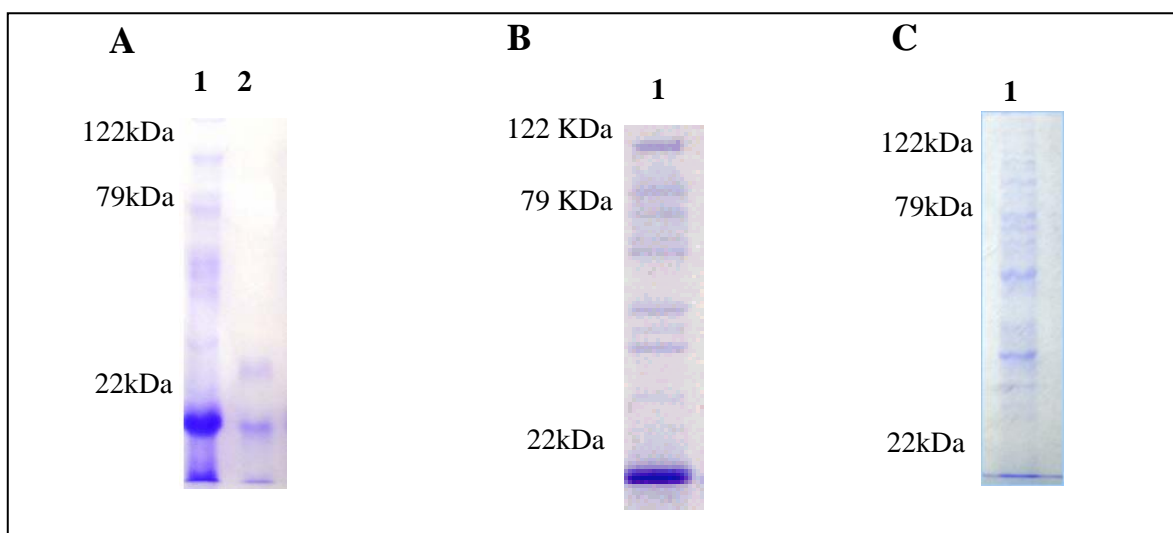


Figura 21. SDS-PAGE das preparações antigênicas, em poliacrilamida a 12,5%, obtidas com a cepa CEMM 01-6-085. **(A) Protocolo I** (1) exoantígeno, (2) antígeno citoplasmático; **(B) Protocolo II** (1) antígeno total; **(C) Protocolo III.** (1) antígeno total.

5.2.3 Avaliação da reatividade antigênica através de Imunodifusão

No tocante às características imunoreativas das preparações antigênicas, foi observado que, à exceção da preparação obtida através do Protocolo IV, todas as amostras foram capazes de reconhecer soros de pacientes com coccidioidomicose (total de 8 amostras), tal como demonstrado na figura 22 para o *antígeno total*, obtida por meio do Protocolo III com cepa CEMM 01-06-085. Foi observado, porém, que as amostras perdiam atividade após estocagem por 6 meses na temperatura de 4°C, se mantendo estável, por mesmo período, quando estocadas a -20 °C e -80 °C. Amostras liofilizadas reconstituídas em tampão PBS não mantinham as propriedades imuno-reativas. Amostra obtida mediante o Protocolo III apresentou melhores resultados, mantendo-se estável por período superior a 1 ano nas condições retrocitadas.

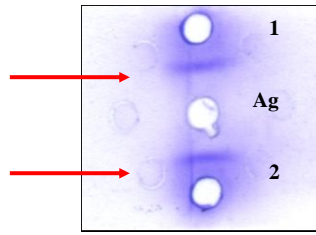


Figura 22. Teste de imunodifusão radial dupla em ágar, obtida com antígenos extraídos da cepa 01-06-085. Orifício central (Ag) preparação *Antígeno total*, obtida pelo Protocolo III; orifício (1) soro de paciente com coccidiodomicose; orifício (2) soro controle (Immy). As setas vermelhas indicam reação positiva ao antígeno.

As preparações antigênicas mostraram reação positiva com soro-controle (Immy) e soros de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial (pesquisa direta e cultura positivas) confirmado para coccidiodomicose. A preparação *antígeno total*, obtida através do Protocolo III, reconheceu também soro de animal com sintomatologia de coccidiodomicose. Para fins comparativos, o antígeno comercial (Immy) não reagiu com uma amostra de soro de paciente com a forma disseminada da doença, mas foi capaz de reagir com soros de 11 indivíduos, sem história clínica de coccidiodomicose, residentes de áreas endêmicas da doença. Todos esses indivíduos foram considerados indivíduos com coccidiodomicose-infecção. Os resultados obtidos com os testes de imunodifusão estão apresentados na tabela 6.

Tabela 7. Reatividade das preparações antigênicas de *C. posadasii* e do antígeno controle de *C. immitis* (Immy) ante amostras de soro de pacientes com coccidioidomicose e indivíduos normais, residentes de zonas endêmicas da doença.

Grupo	Reatividade	
	Antígeno total	Antígeno comercial IDCF (Immy)
Pacientes com coccidioidomicose	6/6	5/6
Pacientes com coccidioidomicose (em tratamento)	2/2	2/2
Animal sintomático	1/1	1/1
Indivíduos com coccidioidomicose-infecção *	0/11	11/11
Indivíduos saudáveis	0/109	0/109
Soro-controle de <i>C. immitis</i> (Immy)	1/1	1/1

* Residentes de zonas endêmicas para a coccidioidomicose no Estado do Ceará

5.3 Etapa III: Diagnóstico molecular

5.3.1 – Extração de DNA

Diferenças qualitativas e quantitativas foram observadas nas amostras de DNA obtidas por intermédio dos três protocolos testados (Tabela 8). Foi observado que as culturas mantidas em meio líquido ofereceram maior rendimento, independente do protocolo utilizado. Quando avaliadas as culturas mantidas em meio líquido, observou-se que o Protocolo A (CTAB) forneceu melhores resultados que o Protocolo B (Triton), uma vez que amostras obtidas apresentaram maiores concentrações de DNA e relação A_{260} / A_{280} mais próxima de 1,8. A extração de culturas em meio sólido com tampão Triton-TE (Protocolo C) forneceu baixas concentrações de DNA e relação A_{260} / A_{280} inferior a 1,0. A amostra de DNA obtida de escarro mostrou absorvância a 280 nm de 0,246 e relação $A_{280} \text{ nm} / A_{260} \text{ nm}$ de 1,5. A concentração de DNA da amostra foi estimada em 615 ng/ μL .

A análise eletroforética das amostras obtidas mediante os três protocolos revelou material com peso molecular acima de 1Mpb e com pouca degradação, adequadas para a amplificação através de *nested* PCR. A figura 23 demonstra o perfil eletroforético das amostras obtidas pelo Protocolo A.

5.3.2 Ensaio de *nested* PCR

A reação de *nested* PCR permitiu a amplificação de uma seqüência de aproximadamente 340 pb em todas as amostras, independentemente do protocolo de extração de DNA. A figura 24 ilustra o resultado da amplificação alcançada com amostra de escarro e cultura filamentosa mantida em meio sólido (CEMM 01-6-085) e extraída com tampão Triton-TE (Protocolo I).

Tabela 8. Grau de pureza e concentração das amostras de DNA de cepas de *C. posadasii*, a partir de culturas mantidas em meio líquido (Protocolo A: CTAB; Protocolo B: Triton-TE) ou meio sólido (Protocolo C: Triton-TE).

Cepa	Protocolo A		Protocolo B		Protocolo C	
	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	concentração*	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	concentração*	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	concentração*
CEMM 01-6-085	1,67	6782	0,85	1927	0,709	530
CEMM 01-6-087	1,70	952	1,12	1587	0,714	420
CEMM 01-6-088	1,91	3520	1,19	1502	0,653	1175
CEMM 01-6-089	1,94	5920	1,35	2607	0,585	792
CEMM 01-6-090	1,87	6550	1,19	1695	0,580	1150
CEMM 01-6-091	2,00	1522	1,28	1255	0,664	697
CEMM 01-6-092	1,78	1252	1,06	1487	0,676	565
CEMM 01-6-101	1,60	3292	1,22	2357	0,743	1255
CEMM 01-6-102	1,81	7500	1,28	1997	0,748	820
CEMM 01-6-103	1,90	1815	1,25	2200	0,680	622

* Expressa em ng/ μ L

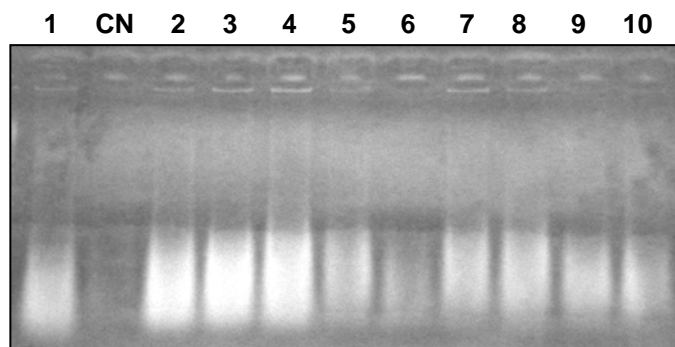


Figura 23. Perfil eletroforético das amostras de DNA total obtidas de culturas de *C. posadasii* mantidas em meio sólido e extraídas tampão CTAB (Protocolo I). As amostras estão representadas com o seguinte código: **1** CEMM 01-6-085; **2**: CEMM 01-6-087, **3**: CEMM 01-6-088, **4**: CEMM 01-6-089; **5**: CEMM 01-6-090; **6**: CEMM 01-6-091; **7**: CEMM 01-6-092; **8**: CEMM 01-6-101; **9**: CEMM 01-6-102; **10**: CEMM 01-6-103; **CN**: controle negativo.

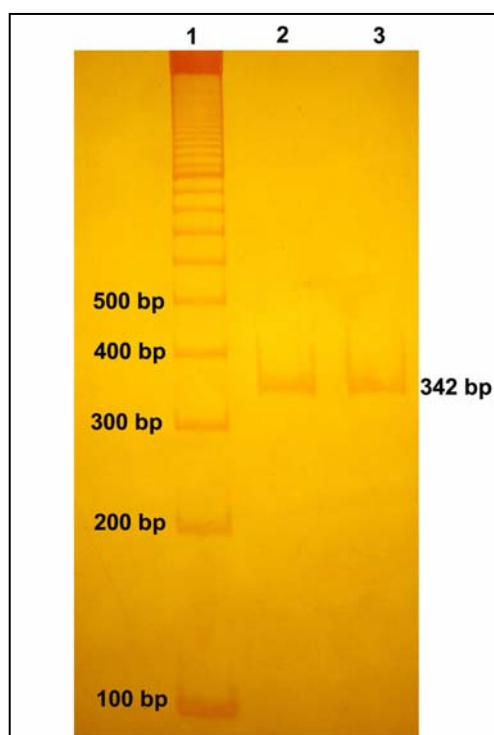


Figura 24. Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida de fragmento do gene Ag2/PRA obtido em reação de *nested* PCR. **1**: marcador de peso molecular 100 pb; **2**: escarro; **3**: cultura filamentosa mantida em meio sólido (CEMM 01-6-085) e extraída com tampão Triton-TE (Protocolo I).

6 DISCUSSÃO

Embora diferenças morfológicas entre *C. immitis* e *C. posadasii* não sejam conhecidas, sabe-se que as referidas espécies distinguem-se quanto à composição de proteínas (PENG et al., 1999) e seqüência nucleotídica de alguns genes (KOUFOPANOU et al., 1997), bem como, na cinética de crescimento em meio de cultura suplementado com NaCl (FISHER et al., 2002). Esses dados estimulam a busca de novos caracteres distintivos, os quais poderão ser úteis no diagnóstico diferencial entre as espécies. Assim sendo, por meio desta pesquisa, foi realizada a fenotipagem de cepas de *C. posadasii* isoladas no Estado do Ceará, através da análise de aspectos morfológicos e fisiológicos do fungo, bem como determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

Foram observadas mudanças na macromorfologia das cepas de *C. posadasii* cultivadas em três diferentes meios de cultura: ágar batata, ágar Sabouraud dextrose a 2% e ágar YEG. Foi evidenciado que a textura glabrosa estava associada apenas a colônias jovens, ao passo que culturas maduras exibiam textura veludosa ou algodonosa. Colônias com cinco dias e textura glabrosa apresentaram poucos artroconídios por campo, enquanto colônias maduras com textura veludosa ou algodonosa mostraram muitos artroconídios. Tais resultados direcionam estudos sobre ultraestrutura dos artroconídios de *C. posadasii*, a fim de se correlacionar precisamente a morfologia dos artroconídios com a formação do micélio aéreo característico das colônias com textura veludosa ou algodonosa. A variação morfológica encontrada entre as cepas de *C. posadasii*, no entanto, está de acordo com a descrição feita previamente por De Hoog et al (2001) para *C. immitis*, confirmando que as referidas espécies são morfológicamente idênticas. Os dados da presente pesquisa sugerem, no entanto, que a descrição morfológica de *C. posadasii* deve ser realizada, preferencialmente, em ágar batata dextrose.

Fisher et al. (2002), ao descreverem a espécie *C. posadasii*, sugeriram que o tamanho dos artroconídios não poderia ser considerado caráter diagnóstico, pois culturas de *C. immitis* e *C. posadasii* mantidas em ágar extrato de malte apresentavam conídios de mesmo tamanho. Na presente pesquisa, a fim de avaliar mudanças estruturais ao longo do tempo, foram realizadas a quantificação e a mensuração dos artroconídios de *C. posadasii* em três meios de cultura distintos, após intervalos de 5 e 20 dias. Os dados mostraram que a dimensão dos artroconídios aumentou com a maturidade das colônias, independentemente do meio de cultura utilizado, até atingirem o tamanho de 7,5 µm e largura de 5,0 µm, corroborando com a

descrição dos conídios de *C. immitis* (DE HOOG et al., 2002). Foi observado também que artroconídios de maior tamanho estavam associados a colônias com textura veludosa ou algodonosa. Diante de tais resultados, foi concluído que a mensuração de artroconídios, em diferentes meios de cultura, não oferecia informações distintivas entre *C. posadasii* e *C. immitis*.

No tocante à cinética de crescimento das cepas em meio suplementado com NaCl, foi observado que o aumento da concentração salina causou a redução do crescimento médio das cepas avaliadas. O padrão de crescimento das cepas em meio suplementado com NaCl a 8% mostrou-se semelhante ao previamente descrito por Fisher et al. (2002) para cepas de *C. posadasii*. Tais resultados reforçam a informação de que o agente etiológico da coccidioidomicose no Estado de Ceará corresponde à espécie *C. posadasii*. Apesar do referido experimento ter sido realizado nas mesmas condições preconizadas por Fisher et al. (2002), as cepas em estudo apresentaram menores taxas de crescimento do que o descrito em literatura, o que sugere a existência de variações intra-específicas.

A halotolerância de *C. posadasii* está diretamente relacionada a sua capacidade de sobrevivência no ambiente. Cepas de *C. posadasii* já foram isoladas em solos da zona semi-árida do Estado do Ceará (CORDEIRO et al., 2006), onde a concentração salina pode atingir até 40% de saturação (BRASIL, 1974). Os mecanismos fisiológicos subjacentes a halotolerância de *Coccidioides* spp., contudo, ainda são desconhecidos. Segundo Vreeland (1987), a halotolerância em microrganismos pode estar relacionada a três importantes eventos: transporte passivo do íon para o citoplasma, garantindo o equilíbrio de concentração com o meio externo; concentração de solutos no espaço intracelular, tais como glicerol e trealose, a fim de manter o balanço osmótico com o ambiente; e controle da perda de água citoplasmática, mediante alterações no envoltório celular. Estudos realizados com a levedura halotolerante *Debaryomyces hansenii* comprovam que a presença de sódio no ambiente pode estimular o crescimento microbiano e ainda proteger a célula de fatores estressantes, tais como temperatura elevada e extremos de pH (PRISTA et al., 2005).

Nesta pesquisa, foi avaliado o efeito da temperatura e do pH sobre as taxas de crescimento das cepas de *C. posadasii* *in vitro*. Com relação à temperatura, a maior taxa de crescimento foi verificada quando as cepas foram incubadas a 30 °C, ao passo que a menor taxa de crescimento foi observada a 20 °C. A ausência de crescimento a 50 e 60 °C indica que as cepas de *C. posadasii* são incapazes de crescer, *in vitro*, em tais temperaturas.

Estudos sobre o efeito da temperatura, *in vitro*, sobre várias espécies fúngicas, mostram que temperaturas acima de 50 °C são capazes de inativar várias enzimas de vias metabólicas importantes, ao passo que temperaturas próximas a 10 °C reduzem a atividade enzimática e alteram o transporte de nutrientes através da membrana plasmática (GRIFFIN, 1994). Neste trabalho, foi demonstrado que temperaturas acima de 50 °C causavam efeito letal sobre as cepas de *C. posadasii*. Por outro lado, conforme esperado, temperaturas abaixo de 10 °C exerceram ação fungistática nas cepas avaliadas. Apesar da sensibilidade térmica detectada *in vitro*, Cordeiro et al. (2006) isolaram *C. posadasii* em solo com temperatura acima de 40 °C. Diversos autores comprovam que *C. immitis* também apresenta tolerância a temperaturas elevadas no ambiente (MADDY, 1965; KOLIVRAS et al., 2001).

Foi demonstrado que *C. posadasii* possui capacidade adaptativa, *in vitro*, frente a variação de pH entre 4,0 a 11,0. Segundo Griffin (1994), a capacidade de crescimento diante de extremos de pH envolve mecanismos celulares capazes de manter o pH intracelular próximo à neutralidade, por meio de H⁺-ATPases, para prevenir a destruição de macromoléculas e garantir o funcionamento enzimático. A resposta à variação de pH no ambiente é intensamente estudada nos fungos *C. albicans*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus nidulans*. Segundo Li et al. (2004), em *C. albicans*, a resposta ao aumento de pH no meio extracelular culmina com a expressão de um fator de transcrição específico, denominado Rim101p, o qual governa a expressão de vários genes relacionados à morfogênese e à patogenicidade em modelos animais. A tolerância de *C. posadasii* ante a extremos de pH estimula a realização de pesquisas nas áreas de proteômica e metabolômica, a fim se compreender o papel de proteínas-chave no metabolismo adaptativo do fungo.

Estudos pioneiros sobre a fisiologia de *C. immitis* mostraram que o fungo pode crescer, *in vitro*, em valores de pH entre 3,5 e 9,0 (KOLIVRAS et al., 2001). Segundo esses autores, *C. immitis* também apresenta tolerância ao estresse hidrogeniônico no meio ambiente, o que lhe conferiria vantagens adaptativas em relação a outras espécies telúricas. Nesta pesquisa, foi evidenciado que *C. posadasii* possui amplo perfil de tolerância, *in vitro*, à variação hidrogeniônica, podendo crescer em valores de pH acima daqueles descritos para *C. immitis*. É possível que o fungo também apresente capacidade de crescimento em amplos valores de pH encontrados no ambiente. Tal habilidade fisiológica pode ter contribuído para o sucesso na dispersão geográfica de *C. posadasii*, o qual é capaz de sobreviver em solos com diferentes características físico-químicas, por todas as Américas. No semi-árido do Estado do

Ceará, estudos técnicos revelam que o pH do solo pode variar entre 4,1 ao máximo de 8,6 (BRASIL, 1973), permitindo, desta maneira, o crescimento de *Coccidioides* spp.

De acordo com Griffin (1994), a utilização de vários compostos como fonte de carbono e/ou nitrogênio pelos fungos patógenos depende da capacidade da digestão de compostos oligoméricos e poliméricos presentes no meio extracelular, com o conseqüente transporte dos monômeros resultantes através da membrana plasmática, fosforilação das unidades de carboidrato ou realização de gluconeogênese a partir de material de outra composição química.

Nesta pesquisa, foi demonstrado que *C. posadasii* tem a habilidade fisiológica de utilizar diversos compostos como fonte de carbono e / ou nitrogênio. Supõe-se que o fungo possua um sistema diferenciado para o transporte intracelular de aminoácidos, uma vez que não foi observado crescimento de nenhuma cepa em meio suplementado com L-aspártico. Apesar da capacidade de utilização de nitrogênio inorgânico não ser comum entre os fungos patogênicos (GRIFFIN, 1994), foi observado que *C. posadasii* utiliza os íons oxidados nitrito e nitrato como fontes de nitrogênio.

O perfil nutricional das cepas estudadas mostrou-se semelhante ao descrito para esférulas e endósporos de *C. immitis* (SIPPEL & LEVINE, 1969), exceto a assimilação positiva de D(-)-arabinose e D(+)-lactose e ausência de assimilação de L-ácido aspártico. Tais dados indicam que, assim como anteriormente demonstrado para *C. immitis*, a espécie *C. posadasii* possui poucas exigências nutricionais. Essa característica permite à espécie a sobrevivência em ambientes naturais inóspitos, tal como o solo do semi-árido nordestino, o qual é caracterizado por vegetação escassa e reduzido conteúdo orgânico. Foi detectado o fato de que as cepas de *C. posadasii* cresciam intensamente em Tween 20 e não cresciam em meio contendo Tween 60 ou Tween 80.

Os *tweens* são surfactantes que podem ser utilizados como fontes de lipídios pelos microrganismos. De acordo com estudos pioneiros realizados por Gueho et al. (1996), a assimilação diferencial de *tweens* é um critério importante para o diagnóstico de *Malassezia* spp. Leveduras do gênero *Candida*, ao serem cultivadas em ágar fubá ou ágar arroz com Tween 80, em baixa tensão de oxigênio, formam estruturas e arranjos micromorfológicos característicos de uma dada espécie (MILAN & ZAROR, 2004). Os resultados obtidos neste estudo estimulam a realização de novas pesquisas sobre as características fisiológicas de *C.*

immitis e *C. posadasii*, que se acredita serem capazes de suscitar informações com potencial diagnóstico entre essas espécies.

Infelizmente, em virtude da virulência de *Coccidioides* spp., não foi possível incluir cepas de *C. immitis* nesta pesquisa. A importação de cepas norte-americanas de *C. immitis* está protegida por normas rígidas de biossegurança dos Estados Unidos, uma vez que o microrganismo é considerado arma biológica naquele País. Acredita-se que a realização dos experimentos aqui descritos com cepas de *C. posadasii* e *C. immitis* simultaneamente poderá trazer informações distintivas entre as duas espécies.

A caracterização fenotípica das cepas de *C. posadasii* compreendeu, ainda, a determinação do perfil de sensibilidade em relação a antimicrobianos *in vitro*, a qual pode ser útil na ampliação do espectro terapêutico para o tratamento da coccidioidomicose. Até o momento, o perfil de sensibilidade de cepas de *C. posadasii*, isoladas no Brasil, ante drogas antifúngicas, não era conhecido.

Sabe-se que, *in vivo*, os artroconídios de *Coccidioides* spp. passam por mudanças morfológicas e originam esférulas repletas de endósporos, as quais consistem no achado patognomônico do fungo em amostras clínicas (GALGIANI, 2003). É possível que a realização de testes de sensibilidade com as estruturas parasitárias do fungo torne possível a obtenção de resultados mais confiáveis, capazes de permitir correlação clínico-terapêutica. Até o presente momento, todavia, essa hipótese foi avaliada em apenas um estudo (HECTOR et al., 1988), baseado em metodologia distinta daquela preconizada pelo CLSI, dificultando, assim, a comparação de seus resultados por outros pesquisadores. Segundo Hector et al. (1988), a principal vantagem da utilização de esférulas em tais testes remonta ao fato de que essas estruturas exibem menor risco biológico do que a forma miceliana do fungo. Apesar desse argumento favorável, os testes de sensibilidade *in vitro* são realizados com estruturas de *Coccidioides* spp. na forma saprofítica, preconizado pelo CLSI, permitindo a obtenção de dados reprodutíveis, os quais podem ser empregados em estudos interlaboratoriais comparativos.

Todas as cepas de *C. posadasii* avaliadas mostraram-se sensíveis aos antifúngicos testados. Não foram detectadas diferenças nos valores da CIM entre as cepas de origem clínica e ambiental, sugerindo que isolados de ambas as fontes possuam o mesmo perfil de

sensibilidade a antifúngicos. Dados comparativos sobre perfil de sensibilidade de isolados clínicos e ambientais de *Coccidioides* spp. são desconhecidos.

Nesta pesquisa, foi observado que a CIM para a caspofungina variou entre 16 e 32 µg/ml, corroborando os achados na literatura para *C. immitis* (GONZÁLEZ et al., 2001). Apesar de apresentar altos valores de CIM, experimentos em modelos animais mostram que a caspofungina é uma excelente opção para o tratamento da coccidioidomicose (GONZÁLEZ et al., 2001).

Segundo Letcher-Bru e Herbrecht (2003), a avaliação da atividade antifúngica da caspofungina, *in vitro*, ainda não foi contemplada pelo CLSI. Desta forma, ainda não se conhecem valores de “breakpoints” definitivos, nem mesmo a correlação entre dados obtidos *in vitro* e a eficácia clínica para várias infecções fúngicas. A eficácia *in vivo* da caspofungina para o tratamento da coccidioidomicose está limitada a poucos estudos (González et al., 2001; Park et al., 2006). Hsue et al. (2004), discutem que, apesar da eficiência *in vitro*, a caspofungina não foi adequada para tratamento de coccidioidomicose disseminada.

O perfil de sensibilidade das cepas de *C. posadasii* diante da anfotericina B mostrou-se semelhante ao descrito previamente por Nakai et al. (2003) para cepas de *C. immitis*. Dados apresentados por outros autores, porém, mostraram que a CIM para cepas de *C. immitis* era maior do que 0,250 µg/ml (LUTZ et al., 1997; LI et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2001), contrariando os resultados obtidos neste estudo, onde a CIM para essa droga variou de 0,0625 a 0,125 µg/ml. A divergência entre esses resultados pode ser explicada pelas variações na metodologia empregada nesta pesquisa, determinada pelo CLSI, a qual se diferenciou quanto à composição do inóculo e do meio de cultura, além do intervalo de leitura.

Foi observado que cetoconazol mostrou atividade *in vitro* contra todas as cepas estudadas, com a CIM variando entre 0,039 a 0,156 µg/ml. Dados da literatura indicam que cepas de *C. immitis* apresentam valores de CIM superiores aos encontrados nesta pesquisa. Segundo Hoepflich e Merry (1984), isolados clínicos de *C. immitis* foram inibidos pelo cetoconazol na concentração de 0,16 µg/ml e Pappagianis et al. (1990) mostraram que a forma parasitária da cepa *C. immitis* Silveira ATCC 28868, atualmente reconhecida como um exemplar de *C. posadasii*, apresentou CIM de 8 µg/ml. Uma vez, porém, que esses autores

não utilizaram a metodologia preconizada pelo CLSI, tais resultados não podem ser considerados para comparação com as cepas deste estudo.

Os valores da CIM para itraconazol e fluconazol variaram de 0,125 a 0,5 µg/ml e 3,125 a 6,25 µg/ml, respectivamente. Tais resultados corroboram dados apresentados por vários autores para cepas de *C. immitis* (LI et al., 2000; LETSCHER-BRU & HERBRECHT, 2003; NAKAI et al., 2003). Com relação ao voriconazol, os dados encontrados nesta pesquisa corroboram o perfil de sensibilidade de cepas de *C. immitis*, descrito por Li et al (2000). Até o momento, não se sabe se *C. immitis* e *C. posadasii* apresentam o mesmo perfil de sensibilidade a antifúngicos *in vitro*. Uma vez que *C. posadasii* é uma espécie nova, tendo sido proposta apenas em 2002, é provável que estudos realizados antes dessa época tenham incluído, simultaneamente, cepas pertencentes a ambas as espécies.

A segunda classe de antimicrobianos testada nesta pesquisa compreendeu as drogas utilizadas para o tratamento da tuberculose pulmonar primária. Sabe-se que a coccidioidomicose apresenta características clínicas, radiológicas e histopatológicas comuns à tuberculose (CASTAÑEDA-GODOY & LANIADO-LABORÍN, 2002) e que, no Estado do Ceará, essas enfermidades possuem limites de ocorrência semelhantes (Anexo II). Com base na hipótese de que, no Estado do Ceará, a coccidioidomicose seja confundida clinicamente com a tuberculose, foi pesquisado se a terapia antituberculose poderia ter efeito inibitório sobre cepas de *C. posadasii in vitro*.

O efeito das drogas antituberculose sobre as cepas de *C. posadasii* foi avaliado em ensaio de macrodiluição, por meio do documento M38-A, proposto pelo CLSI para determinação de sensibilidade a antifúngicos *in vitro*. A escolha desse protocolo baseou-se no fato de que ele permite a padronização de importantes variáveis, tais como composição do meio de cultura, temperatura, período de incubação, tamanho do inóculo e determinação de *end points*, garantindo, desta forma, resultados reprodutíveis. Para determinação da CIM foi utilizada como critério de leitura a inibição de 80% do crescimento fúngico, uma vez que as drogas antituberculose apresentam atividade microbiostática *in vitro*. Desta forma, é esperada a visualização de tênue crescimento residual, denominado *trailing*, em razão da necessidade de entrada das drogas na célula fúngica e conseqüente inibição do metabolismo celular.

Os resultados obtidos mostraram que, à exceção da pirazinamida, todos os demais antimicrobianos foram capazes de inibir o crescimento das cepas de *C. posadasii in vitro*.

Provavelmente, o pH neutro em que o teste foi realizado possa ter interferido no mecanismo de ação da droga, a qual apresenta atividade apenas em pH ácido (MANDEL & PETRI, 2003).

Segundo Mandell e Petri (2002), os agentes antituberculose atuam sobre alvos específicos do metabolismo bacteriano. A rifampicina inibe a síntese do RNA bacteriano, por meio de ligação com a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana. A isoniazida e o etambutol interferem com a síntese de ácidos micólicos da parede celular das micobactérias, mediante inibição de enzimas específicas. Por fim, acredita-se que a pirazinamida altere o potencial de membrana, prejudicando o transporte de nutrientes através da célula da micobactéria. Diante de tais fatos, supõe-se que sítios análogos de ligação a essas drogas estejam presentes na mitocôndria de *C. posadasii*, resultando no efeito fungistático observado. O efeito inibitório foi mais evidente quando as drogas foram utilizadas em combinação, indicando a existência de efeito sinérgico sobre *C. posadasii*. Os resultados alcançados sugerem a realização de estudos sobre o efeito das drogas antituberculose em modelos animais. É provável que a terapia antituberculose tenha algum papel no tratamento e / ou recuperação de pacientes com coccidioidomicose.

A possibilidade de confusão diagnóstica da coccidioidomicose com a leishmaniose visceral no meio local levou a hipótese de que o antimoniato de meglumina, uma droga antiparasitária, seria capaz de inibir o crescimento de *C. posadasii in vitro*. Os resultados mostraram que, nas condições testadas, todas as cepas foram resistentes ao antimoniato de meglumina. Atualmente, o mecanismo de ação desta droga ainda é pouco conhecido. Existem fortes evidências que os antimoniais pentavalentes sejam reduzidos, *in vivo*, a formas trivalentes, interferindo nos processos de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise, causando, por fim, depleção dos níveis do ATP intracelular (TRACY & WEBSTER, 2003). O mecanismo de resistência de *C. posadasii* à referida droga é desconhecido (MANDELL E PETRI, 2003), mas pode estar relacionado a vários processos, tais como: degradação intracelular da droga mediada por enzimas, alteração no sítio de ação da droga, ou ainda superexpressão de proteínas relacionadas a bombas de efluxo, causando diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano.

Nesta pesquisa, aliado aos testes de fenotipagem das cepas de *C. posadasii*, foi avaliado também o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico laboratorial da

coccidioidomicose, por meio da produção de antígenos específicos e detecção de seqüências genéticas exclusivas do fungo.

Dentre as preparações antigênicas testadas, foi demonstrado que o *antígeno total*, obtido a partir do Protocolo III, apresentou melhores resultados quanto ao rendimento e estabilidade frente a várias temperaturas de estoque e reatividade *in vitro*. Comparando os resultados obtidos com o antígeno comercial, preparado a partir de cepas norte-americanas de *C. immitis*, foi observado que o *antígeno total* reconheceu todas as amostras de soros de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para a coccidioidomicose. Indivíduos sem história clínica de coccidioidomicose, residentes em áreas endêmicas da doença, foram reconhecidos apenas pelo referido antígeno comercial. Tais resultados sugerem que o *antígeno total* é uma preparação antigênica com potencial diagnóstico, uma vez que mostrou reatividade apenas com soros de pacientes com a doença.

Nesta pesquisa, foi observado que o soro de um paciente com coccidioidomicose disseminada reagiu apenas com a preparação *antígeno total*. Provavelmente, antígenos oriundos de cepas autóctones de *C. posadasii* apresentam em sua composição moléculas cujos determinantes antigênicos exibem maiores sensibilidade e especificidade diagnóstica.

Os resultados alcançados direcionam estudos futuros que objetivem a identificação dos componentes protéicos envolvidos no reconhecimento dos soros testados, por intermédio de ensaios de *Western blotting*, além da determinação dos índices de sensibilidade e especificidade do antígeno, por meio de ensaios com soros de pacientes portadores de outras infecções pulmonares. Acredita-se que a elaboração de antígenos a partir de cepas de *C. posadasii* locais pode resultar em testes imunológicos de custo reduzido, representando excelente alternativa para o diagnóstico da coccidioidomicose em laboratórios desprovidos de condições de biossegurança adequadas à manipulação de culturas do fungo.

A terceira etapa desta pesquisa consistiu na realização do diagnóstico molecular da coccidioidomicose, por meio de amplificação da seqüência parcial do gene *pra*, específica para *Coccidioides* spp. (BIALEK et al., 2004), mediante reação de *nested* PCR - uma técnica capaz de aumentar a sensibilidade da reação em até 100 vezes. Testes com essa abordagem apresentam baixa sensibilidade, no entanto produzem resultados muito específicos, de grande importância em diagnóstico laboratorial.

Nos últimos anos, métodos baseados na técnica de PCR têm sido utilizados no diagnóstico molecular de infecções sistêmicas causadas por várias espécies fúngicas, tais como *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans* (KANBE et al., 2005) e *Cryptococcus neoformans* (ESPOSTO et al., 2004). Um dos primeiros protocolos para a detecção molecular de *Coccidioides* spp. foi estabelecido por Greene et al (2000), a partir de reação de PCR para amplificação de seqüência do rDNA. Os autores identificaram quatro culturas filamentosas sugestivas de *C. immitis* e confirmaram cada *amplicon* através de seqüenciamento. Posteriormente, Johnson et al (2004) realizaram testes de PCR baseado na amplificação do rDNA para identificação de *C. immitis* em soro de pacientes com coccidioidomicose e de animais infectados experimentalmente.

Apesar de PCR direcionado a amplificação de seqüências conservadas apresentar elevados índices de sensibilidade (GREENE et al., 2000, Johnson et al., 2004), sabe-se que esta abordagem diagnóstica apresenta pouca especificidade (BIALEK, 2005), permitindo a amplificação de várias seqüências homólogas entre indivíduos não relacionados. Desta forma, a fim de excluir resultados falsos, é necessária a análise posterior desses *amplicons* por meio de técnicas como o seqüenciamento ou RFLP com sondas específicas (BIALEK, 2005).

Para o diagnóstico molecular da coccidioidomicose é necessário que as técnicas disponíveis sejam adequadas às amostras clínicas destinadas a pesquisa de *Coccidioides* spp. Desta forma, é desejável que se contemple amostras oriundas do trato respiratório, tais como escarro e lavado broncoalveolar, além de biopsias pulmonares. Assim sendo, o diagnóstico da coccidioidomicose baseado na detecção de seqüências do fungo diretamente em amostras de soro pode gerar resultados falso negativos, uma vez que a forma disseminada da doença é uma condição rara, capaz de acometer entre 1 a 5% dos indivíduos infectados (COX & MAGEE, 2004). Atualmente, não existem protocolos padronizados para extração de DNA de *Coccidioides* spp. a partir de escarro ou lavado brônquico – as principais amostras que costumam chegar ao laboratório de Micologia quando se suspeita de coccidioidomicose. Diante do exposto, nesta pesquisa, foi proposta a detecção do DNA de *C. posadasii* diretamente em amostra de escarro.

Inicialmente, nesta pesquisa, foram testados três protocolos para a extração de DNA de culturas filamentosas de *C. posadasii*. Foi observado que a extração de DNA realizada com tampão CTAB (Protocolo A) forneceu amostras com maiores concentrações e pureza. A extração de culturas em meio sólido com tampão Triton-TE (Protocolo C) resultou em amostras com baixas concentrações de DNA, provavelmente em decorrência da reduzida

quantidade da massa celular fúngica testada. Esse protocolo, todavia, pode ser empregado diretamente em culturas sugestivas de *Coccidioides* spp., o que permite a redução do tempo necessário à liberação do diagnóstico conclusivo e garante segurança ao laboratorista. No protocolo clássico de extração de DNA de culturas de *Coccidioides* spp., desenvolvido por Burt et al. (1995), a técnica descrita é bastante laboriosa e contempla a verificação da viabilidade fúngica durante uma semana, o que torna o diagnóstico baseado nesse protocolo bastante demorado. Adicionalmente, a referida técnica não está padronizada para amostras clínicas.

O protocolo desenvolvido para extração de DNA de escarro forneceu amostra sem degradação, adequada para ensaio de PCR. A extração de DNA foi realizada, propositadamente, com amostra considerada inadequada para análise micológica. De fato, culturas primárias em ágar Sabouraud dextrose a 2% e ágar Mycosel mostraram-se intensamente contaminadas por bactérias comensais da orofaringe. O isolamento de *C. posadasii* a partir dessa amostra só foi conseguido após sucessivos repiques em meio suplementado com antibióticos. Esses resultados confirmam a importância do protocolo desenvolvido para o diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose.

Neste trabalho, foi utilizado o protocolo de identificação de *C. posadasii* baseado na amplificação da seqüência parcial do gene Ag2/PRA, previamente estabelecido por Bialek et al. (2004), a partir de culturas filamentosas e biopsias. Uma vez que o gene Ag2/PRA está presente em apenas uma única cópia por genoma, os autores sugeriram uma reação de *nested* PCR, a fim de aumentar a sensibilidade da técnica de PCR convencional aproximadamente 100 vezes.

Mediante reação de *nested* PCR, nesta pesquisa, foi conseguida a amplificação de uma seqüência de aproximadamente 340 pb em todas as amostras de DNA obtidas das culturas do fungo, independentemente do protocolo de extração, bem como na amostra de escarro. Por meio do programa *BLASTSearch*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, foi comprovado que a seqüência do gene Ag2/PRA (número de acesso: AF013256), depositada no GenBank (*National Center for Biotechnology Information*, EUA), apresentava homologia completa apenas *Coccidioides* sp. Esses dados sugerem que o seqüenciamento do *amplicon* obtido em reação de PCR não é necessário ao diagnóstico laboratorial, uma vez que a reação não admite amplificações cruzadas.

Assim sendo, crê-se que a detecção da seqüência parcial do gene Ag2/PRA, diretamente no escarro, é uma alternativa para garantir o diagnóstico da coccidioidomicose com rapidez e especificidade. O protocolo desenvolvido é exequível até mesmo em laboratórios com recursos limitados. Adicionalmente, a inativação das esférulas fúngicas garantiu a biossegurança necessária à extração de DNA de *C. posadasii*.

Em consequência do risco da manipulação de cultivos artificiais de *Coccidioides* spp, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de métodos alternativos ao diagnóstico micológico. Desta forma, acredita-se haver contribuído para o estabelecimento de estratégias para a melhoria do diagnóstico da coccidioidomicose no Brasil, mediante a produção de antígenos específicos, bem como no desenvolvimento de protocolo que permite detecção molecular do fungo em espécime clínico. Por fim, acredita-se que as características fenotípicas descritas para as cepas de *C. posadasii* poderão auxiliar estudos futuros que objetivem a individualização biológica das espécies *C. immitis* e *C. posadasii*, por intermédio de testes fenotípicos clássicos.

7 CONCLUSÕES

1 A análise morfológica não resultou em informações distintivas entre *C. posadasii* e *C. immitis*. Os dados da presente pesquisa sugerem, no entanto, que a descrição morfológica de *C. posadasii* deve ser realizada, preferencialmente, em ágar batata dextrose.

2 No tocante à cinética de crescimento *in vitro* frente a estresse salino, foi observado que as cepas em estudo apresentaram perfil de crescimento semelhante ao descrito para a espécie *C. posadasii*, o que sugere a identidade do agente etiológico da coccidioidomicose no Estado de Ceará.

3 A tolerância de *C. posadasii* em relação a extremos de pH estimula a realização de pesquisas nas áreas de proteômica e metabolômica, a fim se compreender o papel de proteínas-chave no metabolismo adaptativo do fungo.

4 Os resultados dos testes fisiológicos mostram que *C. posadasii* é uma espécie não fastidiosa, com habilidade de utilizar diversos compostos orgânicos, inclusive íons oxidados como fonte de nitrogênio inorgânico.

5 O perfil de sensibilidade das cepas de *C. posadasii* isoladas no Brasil, relativo a drogas antifúngicas, mostrou-se semelhante ao descrito para as cepas norte-americanas de *C. immitis*, sugerindo que as infecções causadas por ambos os microrganismos podem ser tratadas com o mesmo esquema terapêutico.

6 As cepas de *C. posadasii* foram sensíveis, *in vitro*, às drogas utilizadas na terapia anti-tuberculose, porém mostraram-se resistentes ao antimoniato de meglumina nas condições testadas. Os resultados obtidos indicam que essas drogas podem ter implicações no tratamento da coccidioidomicose.

7 A preparação *antígeno total* reconheceu apenas as amostras de soros de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para a coccidioidomicose, sugerindo o seu potencial para uso em testes diagnósticos da doença.

8 A identificação molecular de *C. posadasii* foi realizada, com sucesso, a partir de amostras de DNA obtidas de culturas filamentosas e amostra de escarro com estruturas parasitárias do fungo. Os protocolos desenvolvidos para a extração de DNA de *C. posadasii* podem ser úteis ao diagnóstico laboratorial da coccidioidomicose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUODEH, R. O.; GALGIANI, J. N.; SCALARONE, G. M. Molecular approaches to the study of *Coccidioides immitis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 5-6, p. 373-380, Oct. 2002.

ALDOUS, W. K. et al. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2471-2473, May 2005.

AMPEL, N. M. et al. Fungemia due to *Coccidioides immitis*. An analysis of 16 episodes in 15 patients and a review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, v. 65, n. 5, p. 312-321, Sep. 1986.

AMPEL, N. M. Measurement of cellular immunity in human coccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 247-262, Dec. 2003.

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 15, n. 27, p. 499-506, Nov. 1941.

BIALEK, R. et al. Coccidioidomycosis and blastomycosis: advances in molecular diagnosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 355-360, Sept. 2005.

BIALEK, R. et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 778-783, Feb. 2004.

BORGHI, A. L. *Coccidioides immitis*: isolation from soil samples in San Luis and Mendoza provinces. **Sabouraudia**, v.15, n. 1, p. 51-57, Mar. 1977.

BOWMAN, B. H.; TAYLOR, J. W.; WHITE, T. J. Molecular evolution of the fungi: human pathogens. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 893-904, Sep. 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Levantamento Exploratório - Reconhecimento de Solos do Estado do Ceará**. DDP, Boletim 28, PE 16, v. II. Recife: DNPEA-SUDENE, 1974.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Volume I**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 236 p.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Evaluation of *Microsporium canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, v. 42, n. 6, p. 499-504, Dec. 2004.

BURT, A. et al. A safe method of extracting DNA from *Coccidioides immitis*. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 42, p. 23, 1995.

CAIRNS, L. et al. Outbreak of coccidioidomycosis in Washington state residents returning from Mexico. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 61-64, Jan. 2000.

CALHOUN, D.L et al. Humoral antibody responses to specific antigens of *Coccidioides immitis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 2, p. 265-272, Aug. 1986.

CAMARGO, Z. P. Técnicas imunológicas em micologia. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 349-357.

CASTAÑEDA-GODOY R.; LANIADO-LABORÍN, R. Coexistencia de tuberculosis y coccidioidomycosis. Presentacion de dos casos clínicos. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México)**, v. 15, n. 2, p. 98-101, abr.-jun. 2002.

COLE, G. T. et al. Isolation and expression of a gene which encodes a wall-associated proteinase of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 416-427, Feb. 1992.

COLE, G. T. Models of cell differentiation in conidial fungi. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 95-132, June 1986.

COMRIE, A. C. Climate factors influencing coccidioidomycosis seasonality and outbreaks. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 688-692, June 2005.

COOKE, J. V. Immunity tests in coccidioidal granuloma. **Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine**, v. 12, p. 35, 1914.

CORDEIRO, R. A. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. **Medical Mycology**, 2006, DOI: 10.1080/13693780600876546.

CORTEZ, K. J.; WALSH, T. J.; BENNET, J. E. Successful treatment of coccidioidal meningitis with voriconazole. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 36, n. 12, p. 1619-1622, June 2003.

COSTA, F. A. M. et al. Coccidioidomicose pulmonar em caçador de tatus, **Jornal de Pneumologia**, v. 27, n.5, set. 2001.

COX, R. A.; BRITT, L. A. Isolation and identification of an exoantigen specific for *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 1, p. 138-143, Apr. 1986.

COX, R.; MAGEE, D. M. Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 804-839, Oct. 2004.

CRUM, N. F.; POTTER, M.; PAPPAGIANIS, D. Seroincidence of coccidioidomycosis during military desert training exercises. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4552-4555, Oct. 2004.

CHILLER, T. M.; GALGANI, J. N.; STEVENS, D. A. Coccidioidomycosis. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 17, n. 1, p. 41-57, mar. 2003.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2 ed. Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2001. 1160 p.

DELGADO, N. et al. A recombinant β -1,3-Glucanoyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3010-3019, June 2003.

DERESINSKI, S. C. Coccidioidomycosis: efficacy of new agents and future prospects. **Current opinion in infectious diseases**, v. 14, n. 6, p. 693-696, Dec. 2001.

DIÓGENES, M. J. N. et al. Inquérito epidemiológico com esferulina em Jaguaribara-CE, Brasil, 1993. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 70, n. 6, p. 525-529, nov.-dez. 1995.

DRUTZ, D. J.; CATANZARO, A. Coccidioidomycosis. Part I. **American Review of Respiratory Disease**, v. 117, n. 3, p. 559-585, Mar. 1978.

ELCONIN, A. F.; EGEBERG, R. O.; EGEBERG, M. C. Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. **Journal of Bacteriology**, v. 87, p. 500-503, Mar. 1964.

ELIAS COSTA, M. R. I. Obtención de un nuevo antígeno del *Coccidioides immitis* y desarrollo de un modelo experimental de enfermedad en ratas Wistar. Tesis Doctoral. **Revista Argentina de Micología**, v. 18, n. 2, p. 2-39, 1995.

EMMONS, C. W. Isolation of *Coccidioides* from soil and rodents. **Public Health Reports (Washington)**, v. 57, p. 109-111, 1942.

ESPOSTO, M. C et al. Determination of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mating type by multiplex PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 12, p. 1092-1094, Dec. 2004.

EULÁLIO, K. D. Coccidioidomicose: uma doença emergente no Brasil. In: II Encontro Brasileiro de Coccidioidomicose, Teresina, 2006. **XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Teresina, 2006, p. 72.

EULALIO, K. D. et al. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 149, n. 2, p. 57-61, Feb. 2001.

FECHINE, M. A. B. **Inquérito sorológico em regiões com condições geoclimáticas favoráveis e casos índices de coccidioidomicose no sertão do Ceará.** 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Medicina - Clínica Médica). Universidade Federal do Ceará, 2005.

FISHER, M. C. et al. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4558-4562, Apr. 2001.

FISHER, M. C. et al. Molecular and phenotype description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-Californian population of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 73-84, Jan.-Feb. 2002.

FOLEY, J. M.; BERMAN, R. J.; SMITH, C. E. X-ray irradiation of *Coccidioides immitis* arthrospores: survival curves and avirulent mutants isolated. **Journal of Bacteriology**, v. 79, p. 480-487, Apr. 1960.

FONSECA, O. J. M.; LACAZ, C. S.; MACHADO, P. A. Inquérito imuno-alérgico na Amazônia. Resultados preliminares. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n. 6, p. 409-416, nov.-dez. 1973.

GALGIANI, J. N. Coccidioidomycosis. **Western Journal of Medicine**, v. 159, n. 2, p. 153-171, Aug. 1993.

GALGIANI, J. N. et al. Coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1217-1223, Nov. 2005.

GALGIANI, J. N. et al. Practice guideline for the treatment of coccidioidomycosis. Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 658-661, Apr. 2000.

GALGIANI, J. N.; GRACE, G. M.; LUNDERGAN, L. L. New serologic tests for early detection of coccidioidomycosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 3, p. 671-674, Mar. 1991.

GOMES, O. M. et al. Coccidioidomicose pulmonar: primeiro caso nacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 24, n. 5, p.167-168, maio 1978.

GONZÁLEZ, G. M. et al. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis in vitro* and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1854-1859, June 2001.

GONZÁLEZ, G. M. et al. In vitro activities of free and lipid formulations of amphotericin B and nystatin against clinical isolates of *Coccidioides immitis* at various saprobic stages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1583-1585, May 2002.

GREENE, D. R. et al. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 92, n. 3, p. 406-410, May 2000.

GREER, N. D. Voriconazole: the newest triazole antifungal agent. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 16, n. 2, p. 241-248. Apr. 2003.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**, 2 ed. New York: John Wiley and Sons Publication, 1994. 472 p.

GROMADZKI, S. G.; CHATURVEDI, V. Limitation of the AccuProbe *Coccidioides immitis* culture identification test: false-negative results with formaldehyde-killed cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 6, p.2427-2428, June 2000.

GUEHO, E.; MIDGLEY, G; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, n. 4, p. 337-355, May 1996.

HECTOR, R. F.; LANIADO-LABORIN, R. Coccidioidomycosis - a fungal disease of the Americas. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 1, e2, Jan. 2005.

HECTOR, R. F.; ZIMMER, B. L.; PAPPAGIANIS, D. Microtiter method for MIC testing with spherule-endospore-phase *Coccidioides immitis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 12, p. 2667-2668, Dec. 1988.

HOEPRICH, P. D.; MERRY, J. M. *In vitro* activities of two new antifungal azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 25, n. 3, p. 339-341, Mar. 1984.

HSUE, G. et al. Treatment of meningeal coccidioidomycosis with caspofungin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 292-294, July 2004.

HUNG, C. Y. et al. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6689-6703, Oct. 2005.

HUNG, C. Y. et al.. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3443-3456, July 2002.

JOHNSON, S. M.; SIMMONS, K.A.; PAPPAGIANIS, D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1982-1985, May 2004.

KANBE, T. et al. Rapid identification of *Candida albicans* and its related species *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* by a single PCR amplification using primers specific for the repetitive sequence (RPS) of *Candida albicans*. **Journal of Dermatological Science**, v. 40, n. 1, p. 43-50, Oct. 2005.

KAUFMAN, L.; VALERO, G.; PADHYE, A. A. Misleading manifestations of *Coccidioides immitis* in vivo. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3721-3723, Dec. 1998.

KE, Y. et al. Unusual forms of immature sporulating *Coccidioides immitis* diagnosed by fine-needle aspiration biopsy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 130, n. 1, p. 97-100, Jan. 2006.

KIRKLAND, T. N.; FIERER, J. Genetic control of resistance to *Coccidioides immitis*: a single gene that is expressed in spleen cells determines resistance. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 1, p. 548-552, July 1985.

KOLIVRAS, K. N. et al. Environmental variability and coccidioidomycosis (valley fever). **Aerobiologia**, v. 17, n. 1. p. 31-42, Mar. 2001.

KOUFOPANOU, V.; BURT, A.; SZARO, T.; TAYLOR, J. W. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives

(Ascomycota, Onygenales). **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 7, p. 1246-1258, July 2001.

KOUFOPANOU, V.; BURT, A.; TAYLOR, J. W. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5478-5482, May 1997.

KUHL, I. A. et al. Coccidioidomicose laríngea: relato de caso. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 62, n. 1, p. 48-52, jan.-fev. 1996.

LACAZ, C. S. Blastomicose sul-americana, reações intradérmicas com a paracoccidioidina, coccidioidina e blastomicetona. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 3, n. 1, p. 11-18, jan. 1948.

LACAZ, C. S. et al. Ensaios preliminares com a prova da coccidioidina em nosso meio. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 15, n. 2, p. 108-110, mar.-abr. 1960.

LACAZ, C. S. et al. Inquérito imunoalérgico com esferulina em um hospital geral de São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 24, n. 12, p. 403-404, dez. 1978.

LACY, G. H.; SWATEK, F. E. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian middens in California. **Applied Microbiology**; v. 27, n. 2, p. 379-388, Feb. 1974.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 513-521, Mar. 2003.

LI, R. K. et al. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1734-1736, June 2000.

LINDSLEY, M. D. et al. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3505-3511, Oct. 2001.

LUTZ, J. E. et al. Activity of the triazole SCH 56592 against disseminated murine coccidioidomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 7, p. 1558-1561, July 2001.

MADDY, K. Observations on *Coccidioides immitis* found growing naturally in soil. **Arizona Medicine**, v. 22, p. 281-288, Apr. 1965.

MANDEL, G. L.; PETRI, W. A. Fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose, da doença pelo complexo *Mycobacterium avium* e da lepra. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003, p. 849-863.

MARTINEZ, R. et al. Coccidioidomicose no Brasil: relato de novo caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, supl. 1, p. 191, 2002.

MARTINS, M. A. et al. Coccidioidomycosis in Brazil. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, n. 5, p. 299-304, set.-out. 1997.

MARTINS, T.B. et al. 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, Apr. 1995.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 89-101.

MILLAR, B. C. et al. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5778-5780, Dec. 2003.

MIRBOD-DONOVAN, F. et al. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 504-515, Jan. 2006.

MITCHELL, J. I.; ROBERTS, P. J.; MOSS, S. T. Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. **Mycologist**, v. 9, n. 2, p. 67-75, 1995.

MONTGOMERY, D.C. **Designs and Analysis of Experiments**, 3 ed. New York: John Wiley and Sons Publication, 1991. 649p.

MORAES, M. A. P. et al. Coccidioidomicose: novo caso brasileiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 559-562, nov.-dez. 1998.

NAKAI, T. et al. In vitro antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1376-1381, Apr. 2003.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos; norma aprovada; documento M38-A do NCCLS**. v. 18, n. 3, Wayne, Pennsylvania Estados Unidos, 2002.

ODDS, F. C. Coccidioidomycosis: flying conidia and severed heads. **Mycologist**, v. 17, p. 37-40, Feb. 2003.

PAIXÃO, G. C.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J.C. Coccidioidomicose e blastomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 237-251.

PAN, S., & G. T. COLE. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 3994-4002, Oct. 1995.

PAN, S.; COLE, G. T. Electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 11, p. 4872-4880, Nov. 1992.

PAN, S; SIGLER, L.; COLE, G. T. Evidence for a phylogenetic connection between *Coccidioides immitis* and *Uncinocarpus reesii* (Onygenaceae). **Microbiology**, v. 140, n. 6, p. 1481-1494, June 1994.

PAPAGIANIS, D. Serologic studies in coccidioidomycosis. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 16, n. 4, p. 242-250, Dec. 2001.

PAPPAGIANIS D. et al. Therapeutic effect of the triazole Bay R 3783 in mouse models of coccidioidomycosis, blastomycosis, and histoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 6, p. 1132-1138, June 1990.

PAPPAGIANIS, D. *Coccidioides immitis*. In: AJELLO, L; HAY, R.T. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, vol. 4, 9 ed. London: Edward Arnold Publishers Ltd., 1998. p. 357-371.

PAPPAGIANIS, D.; ZIMMER, B. L. Serology of coccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 3, p. 247-268, July 1990.

PARK, D. W. et al. Combination therapy of disseminated coccidioidomycosis with caspofungin and fluconazole. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 26, Feb. 2006.

PENG, T. et al. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 2, p. 518-521, Feb. 1999.

PETKUS, A. F. et al. *Coccidioides immitis* in continuous culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 165-167, Aug. 1985.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KRUSE, J. R.; PATTERSON, M. **K Tissue culture, methods and applications**. New York, Academic Press, 1973. p. 406-408.

PLUNKETT, O.; SWATEK, F. E. Ecological studies of *Coccidioides immitis*. **Proceedings of the Symposium on Coccidioidomycosis**, 158-160, Phoenix, Arizona. Washington DC, Public Health Service, 1957.

PRISTA, C. et al. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 8, p. 693-701, May 2005.

PROIA, L. A.; TENORIO, A. R. Successful use of voriconazole for treatment of *Coccidioides* meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2341, June 2004.

PULLIAM, J. D. Experimental irradiated arthrospore vaccine against coccidioidomycosis in mice. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1394-1399, Nov. 1967.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.E.5-E.7.

SANDHU, G. S. et al. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2913-2919, Nov. 1995.

SANGUINETTI C. J., DIAS NETO E., SIMPSON A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 915-918, Nov. 1994.

SCOPEL, R.K. **Protein Purification: Principles and Practice**, 3 ed. New York Springer-Verlag, 1994. 380p.

SCHNEIDER, E. et al. A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. **Journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 11, p. 904-908, Mar. 1997.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Colheita, isolamento primário e laudos laboratoriais. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 63-82.

SIDRIM, J. J. C. et al. Le nord-est Brésilien, région d'endémie de coccidioïdomycose? **Journal de Mycologie Médicale**, v. 7, p. 37-39, 1997.

SIGLER L.; CARMICHAEL, J. W. Taxonomy of *Malbranchea* and some other hypomyces with arthroconidia. **Mycotaxon**, v. 4, p. 349-488, 1976.

SILVA, L. C. L. et al. Coccidioidomicose pulmonar aguda: primeiro surto epidérmico descrito no Ceará – segundo no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 72, n. 5, p. 49-66, maio 1997.

SILVA, T. M. J. et al. Coccidioidomicose pulmonar fatal no semi-árido cearense: relato de um caso e confirmação diagnóstica em animal. In: XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Guarapari. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 32, supl I, p. 483, 1999.

SIPPEL, J. E.; LEVINE, H. B. Sugars and amino acids as carbon, nitrogen, or energy sources for *Coccidioides immitis* spherules and endospores. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 522-524, Sept. 1969.

SMITH, C. E. et al. The use of coccidioidin. **American Review of Tuberculosis**, v. 57, p. 330–360, 1948.

SUN, S. H.. HUPPERT, M. A cytological study of morphogenesis in *Coccidioides immitis*. **Sabouraudia**, v. 14, n. 2, p. 185-198, July. 1976.

TALBOT, N. J. Nucleic acid isolation and analysis. In: TALBOT, N. **Molecular and cellular biology of filamentous fungi. A practical approach**. New York: Oxford University Press, 2001, p. 23-31.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários (continuação): amebíase, giardíase, tricomoníase, tripanossomíase, leishmaniose e outras infecções causadas por protozoários. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003, p. 823-840.

VASTAG, M. et al. Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2153-2156, July 1998.

VAZ, A. et al. Coccidioidomycosis: an update. **Hospital Practice (Minneapolis)**, v. 33, n. 9, p. 105-108, 113-115, 119-120, Sep. 1998.

VERAS, K. N. et al. Coccidioidomycosis: an unusual cause of acute respiratory distress syndrome. **Jornal de Pneumologia**, v. 29 n. 1, p. 45-48, 2003.

VERSIANI, O. Blastomicose sul-americana. Teste cutâneo com coccidioidin. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 6, n. 2, p. 211-214, out. 1946.

VIANNA, H.; PASSOS, H. V.; SANT'ANA, A. V. Coccidioidomicose: relato do primeiro caso ocorrido em nativo do Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 51-55, jan.-fev. 1979.

VREELAND, R. H. Mechanisms of halotolerance in microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 311-356, 1987.

WANKE, B. Coccidioidomicose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005, p. 1237-1245.

WANKE, B. Coccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, supl. 4, p. 375-378, 1994.

WANKE, B. et al. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. **Mycopathologia**, v. 148, n. 2, p. 57-67, Nov. 1999.

WU, J. et al. Pathology case of the month. Occupational hazard? Coccidioidomycosis (*Coccidioides immitis*). **Journal of the Louisiana State Medical Society**, v. 155, n. 4, p. 187-188, Jul.-Aug. 2003.

YUAN, L.; COLE, G. T. Isolation and characterization of an extracellular proteinase of *Coccidioides immitis*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 9, p. 1970-1978, Sept. 1987.

ZIMMERMAN, C. R.; SNEDKER, C. J.; PAPPAGAIANIS, D. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 3040-3042, Dec. 1994.

ANEXO I

Meios de cultura e soluções utilizados na tese

MEIOS DE CULTURA

Ágar batata

Infusão de batatas*	500 mL
Dextrose	10 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

* 250 g de batatas (*Solanum tuberosum*) cozidas em 500 mL água por 1 hora, seguido de filtração em gaze e reconstituição do volume para 500 mL.

Ágar Sabouraud

Peptona	10 g
Dextrose	40 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

Ágar YEG

Extrato de levedura	1,0 g
Glicose	1,0 g
Ágar	1,5 g
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Meio mineral para assimilação de fontes de carbono

NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL
pH 6,5	

Meio mineral para assimilação de fontes de nitrogênio

K ₂ HPO ₄	1,0 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL
pH 6,5	

Uréia de Christensen

Ágar uréia (Christensen's)	29 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água deionizada	q.s.p 1000 mL

SOLUÇÕES

Acrilamida-Bisacrilamida

N,N-metileno-bisacrilamida	0,8 g
Acrilamida	30 g
Água deionizada	q.s.p. 100 ml

Acrilamida 6% para eletroforese DNA

Acrilamida 30%	20 mL
Tampão TBE 5X	20 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Acrilamida 30% para eletroforese DNA

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Azul de bromofenol 0,05%

Azul de bromofenol	5 mg
Água deionizada	q.s.p. 10 mL

Azul de tripan

Azul de tripan	0,4 g
Solução salina	q.s.p. 100 mL

Brometo de etídio

Brometo de etídio	10 mg
Água deionizada	q.s.p. 1 mL

Coloração *Coomassie Brilliant Blue* para SDS-PAGE***Solução Fixadora***

Metanol	50 mL
Ácido acético glacial	10 mL
Água deionizada	40 mL

Solução Coomassie Blue R

Metanol	50 mL
Coomassie Brilliant Blue	0,2 g
Ácido acético glacial	10 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Solução descorante

Metanol	10 mL
Ácido acético glacial	7 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Coloração *Coomassie Brilliant Blue* para imunodifusão***Solução descorante***

Ácido acético glacial	20 mL
Álcool etílico	40 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Solução Coomassie Blue R

Solução descorante	<i>Coomassie Blue R</i>	0,15 g
	q.s.p. 100 mL	

Coloração da prata para detecção de DNA em gel de poliacrilamida

Solução Fixadora

Álcool etílico	15 mL
Ácido acético glacial	0,5 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Solução Oxidante

Nitrato de prata	0,4 g
Solução fixadora	q.s.p. 100 mL

Solução Reveladora

NaOH	40 g
Formaldeído	5 mL
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

Citrato de sódio 5%

Citrato de sódio	5 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL

EDTA 0,5 M

Na ₂ EDTA	186,1 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

pH 8,0

Gel de agarose a 1% para eletroforese de DNA

Agarose	1 g
Brometo de etídio	0,15 µg/mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Gel de concentração (SDS-PAGE)

Acrilamida-Bisacrilamida	625 µl
Tris 0,5M pH 6,8	1250 µl
Água deionizada	2820 µl
SDS 10%	50 µl
Persulfato de amônio 10%	250 µl
TEMED	5 µl

Gel de separação (SDS-PAGE)

Acrilamida-Bisacrilamida	2080 µL
Tris 3M pH 8,8	625 µL
Água deionizada	1990 µL
SDS 10%	50 µL
Persulfato de amônio 10%	250 µL
TEMED	5 µL

Gel de poliacrilamida 6% para eletroforese de DNA

Acrilamida 6%	10 mL
Persulfato de amônia 10%	125 µl
TEMED	12,5 µL

Lactofenol azul-algodão

Ácido láctico	20 g
Fenol	20 g
Glicerina	20 g
Azul-algodão	0,05 g
Água deionizada	20 mL

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	1 g
Água deionizada	q.s.p. 10 mL

SDS 10 %

Dodecil sulfato de sódio	10 g
Água deionizada	q.s.p 100 mL

Solução salina

NaCl	0,85 g
Água deionizada	100 mL

Tampão de amostra para eletroforese DNA (6X)

Azul de bromofenol	0,025 g
Xileno cianol	0,025 g
Glicerol	3 mL
Dodecil sulfato de sódio	0,1 g
EDTA 0,5M pH 8,0	2 mL
Água deionizada	q.s.p. 10 mL

Tampão de amostra para SDS-PAGE

SDS 10%	1,6 mL
Glicerol	0,8 mL
β -mercaptoetanol	0,4 mL
azul de bromofenol 0,05%	0,2 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,0 mL
Água deionizada	4 ml

Tampão de corrida para SDS-PAGE (10X)

Trizma base	30 g
Glicina	42,5 g
Dodecil sulfato de sódio	10 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL
pH 8,3	

Tampão CTAB

CTAB	2 g
Tris 1M	10 mL
EDTA 0,5 M	2 mL
NaCl	0,85 g
β -Mercaptoetanol	0,2 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Tampão de lise para extração de DNA de escarro

Tris 1M	1 mL
EDTA 0,5 M	0,2 mL
Dodecil sulfato de sódio	2 g
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Tampão de lise com TritonX-100

Triton X-100	2 mL
Tampão TE	q.s.p. 100 mL

Tampão PBS

NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,39 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,67 g
NaCl	8,5 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

Tampão TE (10X)

Tris 1 pH 8,0	10 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	2 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE - 5X)

Trizma base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
Na ₂ EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL
pH 8,0	

Timerosal

Timerosal	0,2 g
Água deionizada	1000 mL

Tris 1M

Trizma base	12,1 g
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

pH 8,0

Tris-HCl 0,5M pH 6,8

Trizma base	6,0 g em 40 mL de água deionizada
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Ajustar o pH com HCl 1N

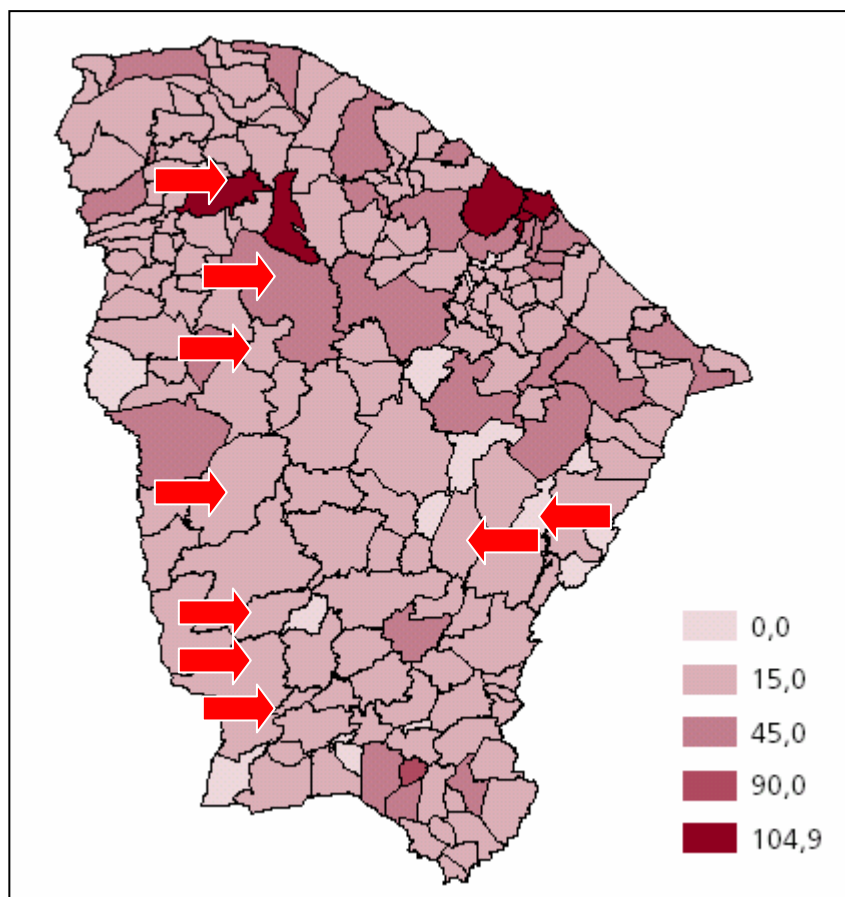
Tris-HCl 3M pH8,8

Trizma base	36,6 g em 40 ml de água deionizada
Água deionizada	q. s. p. 100 ml

Ajustar o pH com HCl 1N

ANEXO II

**Mapa do Estado do Ceará, mostrando as regiões de ocorrência
da coccidioidomicose e tuberculose**



Mapa do Estado do Ceará, mostrando as regiões de ocorrência da coccidioidomicose e tuberculose. As setas vermelhas indicam os municípios com casos com registro de casos de coccidioidomicose. Os números à direita representam a distribuição da taxa de incidência (por 1000 mil habitantes) de todas as formas de tuberculose em 2003. Figura modificada do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005).*

*Referência:

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Ceará / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 20 p.

ANEXO III

PUBLICAÇÕES

Artigo 1

In vitro activities of caspofungin, amphotericin B and azoles against *Coccidioides posadasii* strains from Northeast, Brazil

Mycopathologia (2006)

Artigo 2

Phenotypic characterization and ecological features *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil

Medical Mycology (2006)

Artigo 3

In vitro inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006)

Artigo 4

Perspectivas ao Diagnóstico Molecular da Coccidioidomicose

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (aceito)

Artigo 5

Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum

Clinical Microbiology and Infection (2007)