

16-PLSP - PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E SORO HIPERIMUNE DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* PARA PROVAS OSOROLÓGICAS. NOTA PRELIMINAR

Freitas, R.S.; Vidal, M.S.M.; Binder, C.; Namba, P. & Lacaz, C. da S.

Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da FMUSP, LIM/53 e Laboratório Animalis

Pythium insidiosum é um oomiceto, microrganismo "parafúngico", hidrofílico, responsável por infecções em mamíferos. O processo é piogranulomatoso, exsudativo, causando a perda do animal, pois lesões crônicas apresentam anergia. A pitiose eqüina é doença cosmopolita, comum em regiões tropicais e subtropicais. Casos têm sido relatados no Brasil; na região sul, Estados do Mato Grosso e São Paulo. O diagnóstico laboratorial se faz por exames micológicos e sorológicos. Os recursos sorológicos são muito utilizados como auxílio diagnóstico na monitoração da incidência da pitiose em cavalos. O presente trabalho registra a padronização do antígeno de *P. insidiosum* em provas sorológicas no auxílio do diagnóstico precoce da pitiose.

O objetivo deste trabalho foi obtenção de antígeno metabólico. Amostra H-17 de *P. insidiosum* foi adaptada em caldo Sabouraud-dextrose e células jovens transferidas para frascos de Roux. A cultura foi mantida a 37°C, em fase estacionária por 21 dias. Após este período, as células foram inativadas pela adição de timerosal 1:500. O sobrenadante foi filtrado, concentrado e dosado proteína pelo Método de Lowry. Coelhos albinos foram imunizados com antígeno obtido a partir do antígeno metabólico do isolado H-17 de *P. insidiosum* por via subcutânea. O antígeno foi caracterizado imuniquimicamente, por SDS-PAGE e Immunoblotting, avaliado por imunodifusão dupla de Ouchterlony (ID) e contraímunoeletroforese (CIE) na presença de soro de cavalo com diagnóstico confirmado por exame histopatológico para pitiose, soro hiperimune de coelho anti-*P. insidiosum*, com 10 soros de pacientes para cada micose (paracoccidioidomicose, histoplasmose e aspergilose) e soros controles negativos e na presença de soro de coelho anti-*Conidiobolus ranarum* e anti-*Basidiobolus coronatus* para determinar possíveis reações cruzadas. Resultados **SDS-PAGE**. A amostra de *P. insidiosum* exibiu bandas de peso molecular de 25, 35, 40, 55 e 60 kDa. **IMUNOBLOTTING**. O antígeno detectou no soro eqüino uma banda de 40 e outra de 60kDa. No teste de **ID** realizado com diluição seriada do antígeno metabólico de *P. insidiosum*, verificou-se a presença de 2 bandas de precipitação com identidade total, título de 1:16, frente ao anticorpo policlonal (soro de coelhos), com 1 banda de precipitação com identidade total e frente a soro de pacientes sadios e com outras micoses não ocorreu reação cruzada. O anti-*C. coronatus* e anti-*B. ranarum* não reagiram com o antígeno de *P. insidiosum*. Na reação de **CIE** o soro de cavalo com pitiose e diluição seriada teve um título de 1:16 frente ao antígeno em estudo. Segundo Mendoza (1987), a ID em eqüinos com pitiose apresentam 6 bandas de precipitação independentemente da cronicidade da lesão, com 100% de positividade. Nosso antígeno metabólico detectou 2 bandas de anticorpos precipitantes e o soro hiperimune de coelho anti-*P. insidiosum* verificou 1 banda de precipitação. Soros humanos com outras enfermidades e soros humanos normais não reagiram no teste de ID demonstrando sua especificidade.

Mendoza *et al.*, 1986/1992, o imunoblott de antígeno metabólico de amostras de *P. insidiosum* reconheceu 3 precipitógenos do microrganismo: 25,30 e 32 kDa. Nosso antígeno reconheceu 2 precipitógenos do microrganismo: 40 e 66 kDa.

Área de Concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública.