

## IMUNOLOGIA DA BLASTOMICOSE SUL AMERICANA — I — Resultados preliminares na imunoprecipitação. \*

WILLIAM BARBOSA \*\* JOANA ROSA MENDONÇA \*\*\* e RAQUEL LOPES DE OLIVEIRA \*\*\*

### RESUMO

Estudamos soros de 24 pacientes, bem documentados, de blastomicose sul americana.

De 1 a 12 amostras do mesmo soro foram testadas contra antígeno, extraído da forma leveduriforme do *P. brasiliensis*, em concentrações que variaram de 50 a 200 mg/ml, pela técnica de imunodifusão em suporte de agar a 2% e por imunoeletroforese em acetato de celulose e agarose a 1%. Observamos o aparecimento de faixas de precipitação em número de 1 a 3 pela imunodifusão dupla e 1 a 4 faixas na zona do catódio na imunoeletroforese. Não foram observadas reações cruzadas com micoses profundas, comuns em nosso meio, nem falsa reação positiva em várias doenças, principalmente naquelas que clinicamente servem para diagnóstico diferencial de blastomicose sul americana, por se confundirem com ela, em nosso meio.

### INTRODUÇÃO

A blastomicose sul americana de grande prevalência entre nós

adquire em Goiás, por condições desconhecidas, talvez ecológicas, de variação de cepas ou outras, aspectos clínicos inusitados. Frequentemente observam-se em crianças e adultos jovens a forma linfático-abdominal, a forma disseminada aguda com lesões ósseas e menos comumente lesões tegumentares de aspecto hanseniforme, quadros clínicos todos estes que se acompanham de alterações profundas do elektroforegrama, algumas vezes se assemelhando a verdadeiras gamopatias parasitárias, isto quando se analisa apenas o perfil elektroforético em papel de filtro (1, 2, 3, 4, 6).

Por outro lado, admite-se haver correlação entre as alterações elektroforéticas, evolução clínica da doença e presença de certos anticorpos no soro desses pacientes, dentre eles precipitininas (1, 6, 9).

\* Trabalho realizado no Instituto de Patologia Tropical (IPT) da Universidade Federal de Goiás (UFGO), com auxílio da COPERCOPE.

\*\* Professor Titular do Departamento de Medicina Tropical do IPT/UFGO.

\*\*\* Técnicas de Laboratório do IPT/UFGO.

Sabe-se que as técnicas de imunodifusão, seja a dupla difusão de Ouchterlony seja a imunoelétroforese de Grabar, têm sido aplicadas com êxito no estudo imunológico de diversas micoses; (7, 8, 17), ao contrário, essas técnicas têm sido pouco usadas no estudo da blastomicose sul americana; todavia os dados fragmentários existentes (10, 13, 15, 16, 18) nos permitem supor que grande importância poderá desempenhar o emprego destes métodos no conhecimento da imunologia dessa doença. Com efeito, em mais de 80% dos casos estudados e, com diferentes técnicas de imunodifusão, foram demonstrados, nos casos em atividade, anticorpos precipitantes (16, 18).

Por esses motivos, após obtenção do antígeno, testamo-lo contra soros de pacientes de blastomicose sul americana bem documentados, diagnosticados pelo exame direto. Nos experimentos preliminares, usamos proporções variáveis do antígeno e imunesoro. Inicialmente, trabalhamos com o antígeno inteiro contra soros inteiros, isto é, sem diluí-los, depois contra soros diluídos a 1/2, 1/4 e 1/8.

Logo, experimentamos o antígeno sem diluir e diluído nas mesmas proporções anteriores contra soros diluídos e concentrados duas ou três vezes.

Os resultados nos induziram a trabalhar com o antígeno diluído a 1/4 contra soros inteiros na reação de prova.

Como meio de suporte da reação experimentamos vários, bem como para análise imunoelétroforetica.

Testamos, também, a especificidade do antígeno contra soros de várias doenças.

Estudamos, preliminarmente ao azar, amostras de soros de pacientes de blastomicose sul americana pela imunodifusão em gel de agar (Ionagar) a 2% e pela imunoelétroforese em acetato de celulose.

Logo depois passamos a estudadas evolutivamente soros de 30 pacientes em agarose a 1 e 2% por imunodifusão e por imunoelétroforese.

Pela análise imunoelétrofética, buscamos caracterizar linhas antigenicas comuns a todas as formas clínicas, e, por ventura, alguma sugestiva de indicar maior gravidade, traduzir imunidade ou dar algum informe sobre o prognóstico.

Na suposição de que anticorpos macro-moleculares, do tipo IgM, pudessem aparecer durante fases de reagudização da doença ou em sua fase inicial primária, buscamos investigar a conotação das taxas de imunoeglobulinas IgG, IgA e IgM, principalmente da última, aos valores semi-quantitativos da reação de imunoprecipitação em gel e aos valores do eletroforegrama. Em alguns soros estudamos o comportamento da imunodifusão antes e após cição pelo mercaptoetanol. Como outro método, fizemos absorção específica dos anticorpos por saturação do soro com antígeno ce-

lular e repetimos as dosagens de imunoglobulinas. Fizemos, ainda, a absorção inespecífica de anticorpos com soros anti IgG e IgM alternadamente, e, após, repetimos a prova de imunodifusão dos soros de B.S.A. contra o antígeno celular.

Nesse estudo evolutivo da imunologia da B.S.A., observamos, paralelamente, o comportamento dos anticorpos fixadores do complemento pelas técnicas de Maltaner e Maltaner e pela microtécnica de Fulton e Dumbell. Bem como tivemos o ensejo de aproveitar as formas leveduriformes do *P. brasiliensis* dislipidizado, na investigação de anticorpos fluorescentes pela técnica indireta.

A finalidade deste trabalho é dar conta das observações preliminares da reação de imunoprecipitação em gel de agar (Ionagar) a 2% e da análise imunoelétrofética em acetato de celulose dos soros de pacientes com blastomicose sul americana feitos com antígenos extraídos da fase leveduriforme do *P. brasiliensis*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

**Antígeno:** Culturas de três cepas de *P. brasiliensis* (*P.b.*) isoladas no Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical serviram, indiferentemente, para o preparo do antígeno. O *P. b.* foi cultivado em garrafas tipo Roux em agar Sabouraud por três meses, a 37°. Verificamos, posteriormente, que

o antígeno ativo poderia ser obtido já no 15.º dia de crescimento.

#### Preparo do antígeno:

Removeu-se, delicadamente, com espátula, da superfície do meio, a massa cultivada e colocou-se em salina tamponada, mertiolada, lavou-se por centrifugações sucessivas de 4 a 6 vezes. Ressuspendeu-se o sedimento em salina e rompeu-se as células por congelação e descongelamento sucessivos, agitando-se sempre, brandamente, em agitador universal à baixa temperatura com auxílio de pérolas de vidro. Em seguida, submeteu-se o material a homogenização em Virtis sob banho de gelo — 20.000 rotações por minuto durante uma hora — (verificamos, depois, ser dispensável esse passo). Liofilizamos o material. Pesamos o liofilizado e acrescentamos salina tamponada de modo a obter a concentração de 200 miligramas por ml. Agitamos bem e guardamos em geladeira por 24 horas depois do que centrifugou-se em centrífuga refrigerada a 4° C — 20.000 r.p.m. O sobrenadante foi o antígeno usado neste trabalho.

**Imunesoros:** a) Especificos-soros de 24 casos de blastomicose sul americana bem documentada representados por 110 amostras, variáveis em número de 1 a 15 para cada paciente, colhidos durante os anos de 1971 e 1972, com intervalos de uma semana (durante o período de internação) e suas respectivas alíquotas, guardadas em geladeira a

4º C ou em congelador a menos 20º C até o seu uso, foram usados nesta investigação.

Esses soros foram testados inteiros contra o antígeno diluído a 1/4, 43 amostras foram retestadas concentradas duas vezes contra a mesma diluição do antígeno.

b) Testemunhas: — Em pregamos 110 soros, 33 de malária, 40 de leishmaniose tegumentar americana, 16 de Pênfigo Folíaco sul americano e 22 com vários diagnósticos, dentre esses, 1 de doença de "Jorge Lôbo", 6 de Cromomicose e 5 de Esporotricose, todos foram testados sem diluir contra o antígeno diluído a 1/4.

Todos os soros, tanto os específicos como os testemunhas, provieram de pacientes atendidos no Departamento de Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e foram conservados com preservativo (azida sódica ou mertiolato) a 4º C ou a menos 20º C em congelador até o uso.

**Técnicas imunológicas:** — Dos soros específicos foram dosadas as proteínas comparativamente pelo método do biureto (11) e por refratometria (refratômetro de ABBÉ) e feita eletroforese em acetato de celulose. Paralelamente foram determinadas as imunoglobulinas pela técnica de imunodifusão radial reversa (\*).

A dupla difusão em gel de Agar (ionagar), foi feita pela técnica Ouchterlony em lâmina de

microscopia (14), e a imunoelétroforese foi efetuada em fita de acetato de celulose (cellogel). Corrida do soro durante 1 hora ou do antígeno por 20 min. a difusão posterior por 24 horas. As fitas e lâminas foram coradas pelo método do amido schwarz ou pela fucsina básica.

## RESULTADOS

### 1. Eletroforese em acetato de celulose

1.1 — A eletroforese em acetato de celulose, embora houvesse sido realizada apenas na primeira amostra, de cada soro, serviu para demonstrar mais uma vez a hipergamaglobulinemia compatível com doença em atividade em 75% dos casos (1).

1.2 — A dosagem de imunoglobulina pela técnica radial reversa, também dessas amostras, detectou aumento das taxas de IgG em 10 casos e aumentos de IgM em 15 casos.

### 2. Imunodifusão

2.1 — Em soros testemunhas de pacientes com outras doenças, nesse grupo constituído de 110 soros de pacientes, de várias etiologias, parasitárias, não encontramos qualquer reação positiva na imunoprecipitação.

2.2 — Soros específicos de pacientes de blastomicose sul americana — nesse grupo, representado por 110 amostras de soros de 24 pacientes com blasto-

\* Técnica introduzida pelo Dr. William Ferreira Ayres em nosso Serviço.

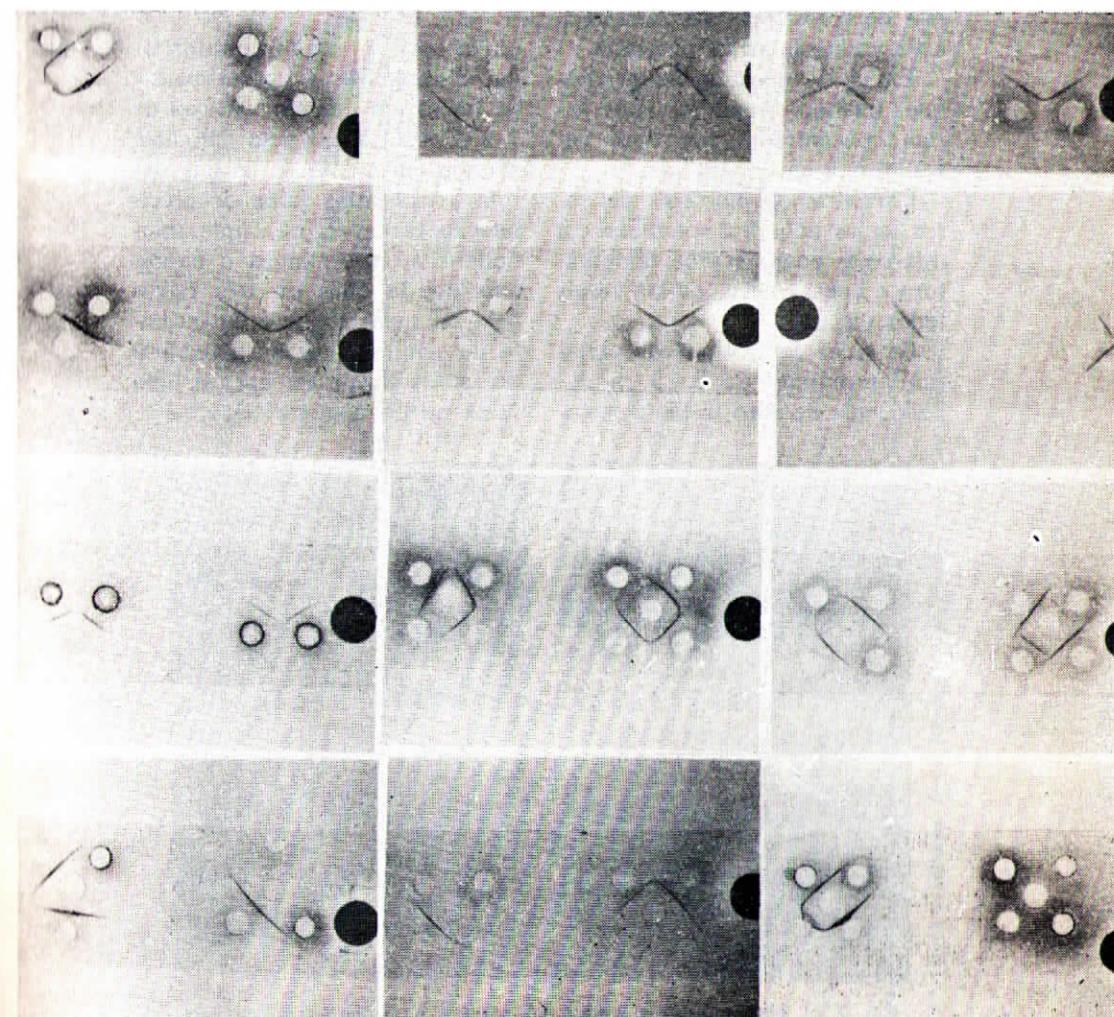


Fig. 1 — Observa-se na imunodifusão número de faixas variável de 1 a 3, com identidade total ou parcial em vários soros de B.S.A. contra antígeno da fase leveduriforme do P.b.

micose sul americana, que foram estudados em seis experimentos consecutivos, observamos que 23 pacientes apresentaram precipitanas circulantes detectáveis na imunoprecipitação, em uma fase qualquer de sua evolução.

Por outro lado, verificamos reações negativas em várias amostras de soros, colhidas durante a observação daqueles pacientes.

Em cinco amostras observamos que, quando negativas, após serem concentradas por duas vezes, tornaram-se positivas.

Encontramos amostras de soros, cujas alíquotas mantidas em diferentes condições de temperatura e conservação, deram resultados díspares.

Os arcos de precipitação variaram em número de 1 a 3, na dependência de soro testado, inclu-

sive no soro do mesmo paciente, em função da amostra, e mostraram anticorpos com identidade parcial ou total — Fig. 1 e 2.

Os protocolos dos experimentos com os resultados acham-se resumidos na tabela I.

### 3. Imunoelétroforese

Na análise imunoelétrofórica observamos o aparecimento de faixas em número variável de 1 a 4, sempre no polo catódico. Mesmo em alguns soros que deram apenas uma faixa de precipitação em agar, na dupla imundifusão, constatamos o aparecimento de duas ou três faixas pela imunoelétroforese em acetato de celulose. Porém, a maioria dos soros revelaram apenas uma faixa na imunoelétroforese.

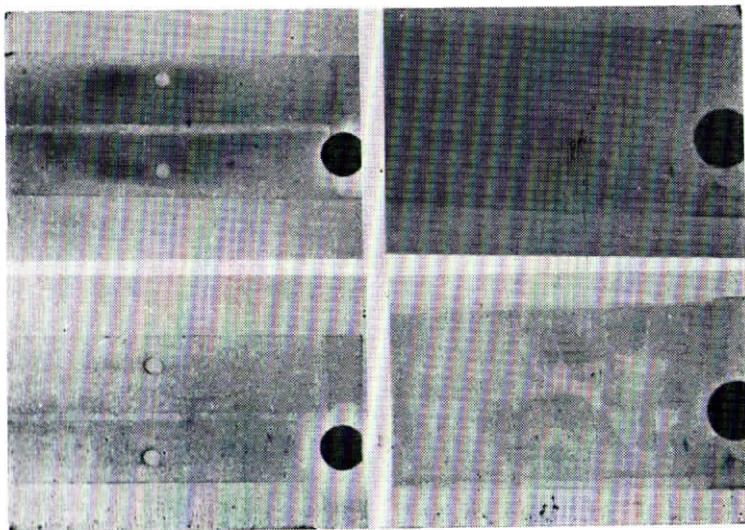


Fig. 2 — Na imunoelétroforese em agarose à esquerda, ou em acetato (cellogel) à direita observa-se sempre no polo catódico faixa única no primeiro, e até 4 faixas no 2º (parecendo corresponder às várias classes de IgG.)

TABELA I

Sinópse do estudo de soros de B.S.A. pela imunoprecipitação em gel com antígeno da fase leveduriforme do **P. brasiliensis** I.P.T. — UFGO.

EXPERIMENTOS		N.º DE SOROS	N.º DE AMOSTRAS	RESULTADOS		OBSERVAÇÕES
				POSIT.	NEGAT.	
1.º	(Antígeno da 1.ª partida. 50 mg/ml)	12	30	19	11	Soros inteiros
2.º	(Antígeno da 1.ª partida. 50 mg/ml)	7	16	13	3	Soros inteiros. Repetidas amostras. 7 soros anteriores.
3.º	(Antígeno da 1.ª partida. 50 mg/ml)	14	36	30	6	Soros inteiros. 7 soros novos.
4.º	(Antígeno da 2.ª partida. 50 mg/ml)	16	43	34	9	Soros inteiros (2 soros novos)
5.º	(Antígeno da 2.ª partida. 50 mg/ml)	12	41	39	2	Soros concentrados 2 vezes. 1 soro novo.
6.º	(Antígeno da 2.ª partida. 50 mg/ml)	10	18	17	1	Soros inteiros (2 soros novos).
TOTAL		24*	110*	152	32	

\* Soros e amostras foram retestados repetidamente nos vários experimentos.

## COMENTÁRIOS

O estudo de soros de pacientes de B.S.A. pela imunodifusão em gel, demonstrou faixas de precipitação isoladas ou múltiplas até 3, no decurso da doença em atividade. Alguns soros só reagiram quando empregados sem diluir, outros deram reações positivas mesmo diluídas até 1/16. A correlação entre as precipitininas presentes e o seu teor será estudada em relação ao quadro clínico e a outros anticorpos presentes, bem como, quanto ao teor de imunoglobulinas em próximo trabalho. Em verificação preliminar, pareceu-nos que existe correlação entre os anticorpos presentes e o aumento de IgG, todavia, muitos pacientes apresentaram também aumento de IgM. Em pacientes clinicamente "curados" e observados a longo tempo, as reações de precipitininas foram negativas quando usamos os soros inteiros e o antígeno 1/4. Em alguns soros, antes positivos, cujas amostras inteiros, (sem diluir) colhidas no período da evolução deram resultados negativos, observamos que as reações tornaram-se positivas, ao se concentrar os soros duas ou três vezes.

O sistema de precipitininas na blastomicose sul americana parece muito específico, pois, não observamos nenhuma reação falsa positiva, empregando soros de várias doenças em variadas concentrações contra o antígeno concentrado ou diluído. Não consta-

tamos, também, reações cruzadas com único soro da doença de "Jorge Lobo" disponível, estudado em variadas diluições e em vários suportes. Também não observamos reações cruzadas com soros de Cromomicose e Esporotricose.

Infelizmente, não dispusemos de soros de pacientes de Histoplasmose ou Blastomicose Norte Americana para testá-los. Como aquela doença é rara em nosso meio e essa última não ocorre, e já é conhecida a reação cruzada entre elas e a doença de Lutz Almeida e como também fugia ao escopo deste trabalho, não estudamos a comunidade antigênica desses sistemas.

As análises imunoelétricas de soros de blastomicose em suporte de acetato de celulose, revelaram faixas, única ou múltiplas até 4 sempre no polo catódico, parecendo traduzir identificação com diversas sub-classe de IgG.

Nesses experimentos iniciais nos ficou a impressão de que pela imunodifusão em gel, somos capazes de detectar precipitininas no soro de pacientes com blastomicose sul americana, tanto em atividade clínica quanto sorológica, dependendo das quantidades ótimas que proporcionamos à reação. E, por outro lado, vislumbra-se a possibilidade de padronizar-se método semi-quantitativo muito útil para o estudo dessa doença. Parece-nos, contudo, que deve haver muitos cuidados nas padronizações técnicas

e no estudo da cinética dos anticorpos precipitantes, para que se possa interpretar devidamente as reações.

### IMMUNOLOGY OF BLASTOMYCOSIS. PRELIMINARY RESULTS WITH IMMUNOPRECIPITINS IN SOUTH AMERICAN BLASTOMYCO-SIS

The sera from 24 patients with South American blastomycosis have been studied. 2 to 12 samples of the same serum were tested by immunodiffusion in 2% agar and by immunolectrophoresis on cellulose acetate and on 1% agarose against an antigen extracted from the yeastlike organisms in concentrations varying from 50 to 200 mg/ml. 1 to 3 bands of precipitation were observed by double immunodiffusion and 1 to 4 precipitant arcs appeared near the cathode in immunolectrophoresis. Neither cross-reaction with other mycoses nor false positive reactions were observed.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, W. — Blastomicose sul americana — Contribuição ao seu estudo no Estado de Goiás — Tese — Oficina da Universidade Federal de Goiás — 1968.
2. BARBOSA, W. — Blastomicose Sul Americana e Contribuição Para Seu Conhecimento Clínico — J. Soc. Cienc. Med. Lisboa — 84:987-998, 1970.
3. BARBOSA, W. — In Doenças Transmissíveis, 1.ª edição, São Paulo, 1972 — Blastomicose Sul Americana — 44-55.
4. BARBOSA, W., DAHER, R.R., & OLIVEIRA, A.R. — Forma Linfática Abdominal da Blastomicose Sul Americana. Rev. do Instituto Med. Trop. de São Paulo, 10: 16-27, 1968.
5. BARBOSA, W., NETO, J.C.A., SOUSA, M.C. de — Eletroforese das Proteínas Séricas na Blastomicose Sul Americana. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. 2:42-43, 1968.
6. BARBOSA, W., RORIZ, E.J., PEDRA, G., BORGES, C., & GAMARSKY, J. — Blastomicose Óssea, Revisão de Casos — Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. 2: 43, 1968.
7. BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., CAPRON, A. & FRUIT, J. — Analyse Immunoélectrophoretique D'Extraits Cellulaires et de Millieux de Culture de Malades Attentifs D'Aspergillome Bronchopulmonaire. Ann Inst. Pasteur (Paris) 167:72-97, 1964.
8. BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEN, S. & VAUCELLE, T. — Premiers Caractérisations D'Activités Enzymatiques sur Les Immunoélectrophorogrammes des Extraits Antigéniques de Histoplasmose Capsulatum. Conséquences Diagnostiques Pratiques. Ann. Soc. Belge Med., Trop. 47:425-434, 1967.
9. FAVA NETTO, C. — Contribuição Para o Estudo Imunológico da Blastomicose de Lutz — Rev. Inst. Adolf Lutz (São Paulo) — 11:99-194, 1961.
10. FERRI, R.G. — Estudo Imunoquímico de Antígenos Intracelulares Hospital (Rio de Janeiro) 59:917-024, 1961.
11. CORNALL, A.G., BARDAWIL, D.J. & DAVID, M.M. — Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. J. Biol. Chem. — 177: 151, 1949.
12. GRABAR, P. & WILLIAMS, JR. C.A. — Méthode Permettant L'Etude Conjugée des Propriétés Eléctrophorétiques et Immunochimiques D'un Mélange de Protéines. Applications au Sérum Sanguin. Biochim. et Biophys. Acta. 10:193-194, 1953.
13. LACAZ, C. da S., FERRI, R.G., FAVA NETTO, C., & BELFORT, E. — Aspectos Imunoquímicos na Blastomicose Sul Americana e Blastomicose Queloidiana. Med. Cient. Farm. 298:63-74, 1962.
14. OUCHTERLONY, O. — In Vitro Method for Testing the Toxin Producing Capacity of Diphtheria Bacterium. Acta Path. et Microbiol. Scandina., 25:186-191, 1948.
15. NEGRONI, R. — Les Mycoses Bronco-pulmonares en la República Argentina. Torax (Montevideo) 19:67-71, 1970.
16. RESTREPO, A. — La Prueba de Immunodifusión en el Diagnóstico de la Pneumococcidioidomycosis. Nidolumella. 4:111-230, 1968.

17. VAUCELLE T. — Contribution à L'Etude Immunologique des Histoplasmosis. Tese de Doctorado. Francia. Facultade Mixta de Medicina e Farmacia de Lille, 1969.
18. YARZABAL, L.A. — Anticuerpos Precipitantes Específicos de la Blastomicosis Sudamericana Revelados por Immuno-eletroforesis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 13(5):320-327, 1971.