

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO IMUNOLÓGICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE. REAÇÕES INTRADÉRMICAS EM PACIENTES COM DOIS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS E DOIS HETERÓLOGOS

Celeste FAVA NETTO (1), Maria Auxiliadora Gurgel GUERRA (2) e Elizabeth Oliveira da COSTA (3)

RESUMO

Foram realizadas reações intradérmicas simultâneas com quatro antígenos: paracoccidiodina-polissacáride, paracoccidiodina filtrado, histoplasmina de *H. capsulatum* e histoplasmina de *H. duboisii*, em 100 pacientes de paracoccidiodomicose. A pesquisa teve por finalidades: comparar entre si dois antígenos obtidos de *P. brasiliensis* padronizados e correntemente utilizados; comparar entre si histoplasminas obtidas do *H. capsulatum* e do *H. duboisii* e verificar a positividade à reação de histoplasmina em pacientes de paracoccidiodomicose. A reação à paracoccidiodina polissacáride foi positiva em 77%, à paracoccidiodina filtrado em 67% e a ambas as histoplasminas em 24% dos pacientes.

INTRODUÇÃO

O Subcomité de Procedimentos Diagnósticos do Comité para Estudos das Micoses da Organização Pan-Americana da Saúde, ao qual um de nós pertence (CFN), está altamente interessado em estudos comparativos que possam indicar qual o antígeno mais adequado para determinada reação imunológica. Algumas pesquisas foram realizadas com antígenos previamente padronizados, quer em pacientes de paracoccidiodomicose, quer em animais experimentalmente infectados, no estudo da reação intradérmica. MACKINNON & col.¹¹, HOUNIE & ARTAGAVEYTI-ALLENDE⁷, LACAZ & col.⁸, FAVA NETTO & RAPHAEL³, MOTA¹², BARBOSA², RESTREPO & col.¹⁴, ALBORNOZ & ALBORNOZ¹, GREER & col.⁶ e LIMA¹⁰.

Os antígenos utilizados em tais pesquisas foram essencialmente a paracoccidiodina-fil-

trado e a paracoccidiodina-polissacáride. A presente pesquisa foi idealizada para se ter uma comparação entre estes dois tipos de antígenos através da realização da prova intradérmica nos mesmos pacientes. A oportunidade foi aproveitada para verificar a ocorrência de reações positivas à histoplasmina em pacientes de paracoccidiodomicose, bem como para comparar duas histoplasminas, uma obtida do *Histoplasma capsulatum* e outra do *Histoplasma duboisii*.

MATERIAL E MÉTODOS

A - Antígenos

1) *Paracoccidiodina-polissacáride* — Obtida e padronizada segundo FAVA NETTO & RAPHAEL³.

(1) Professor Titular — Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

(2) Auxiliar de Ensino — Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

(3) Auxiliar de Ensino — Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

2) *Paracoccidioidina-filtrado* — Forne-cida pelo Dr. Schneidau. Obtido de culturas da fase miceliana do *P. brasiliensis*, sob agi-tação constante. O filtrado das culturas foi precipitado pelo etanol, redissolvido e repre-cipitado. Após a terceira precipitação com etanol era secado a vácuo. Tal tipo de anti-geno é essencialmente o estudado e padroni-zado por RESTREPO & SCHNEIDAU¹³ e RES-TREPO & col.¹⁴. A solução empregada con-tinha 200 µg/ml ou 20 µg em cada dose intradérmica.

3) *Histoplasmina* — Preparada em nos-so laboratório, a partir de uma única amo-stra de *Histoplasma capsulatum* cultivada em meio de SMITH¹⁵ durante 4 meses à tempe-ratura ambiente. O filtrado constituía o anti-geno. Tal antígeno foi utilizado na diluição a 1:1000. Esta diluição se demonstrou ade-quada em numerosas provas intradérmicas realizadas simultaneamente com histoplasmi-na padronizada nos Estados Unidos da Amé-rica do Norte. A amostra do *H. capsulatum* utilizada foi isolada a partir de fezes de morcego quando estudamos um surto de his-toplasmose epidêmica ocorrido no litoral nor-te do Estado de São Paulo (FAVA NETTO & col.⁴).

4) *Histoplasmina duboisii* — Obtida pe-lo cultivo de uma amostra de *Histoplasma duboisii* em meio de SMITH¹⁵ à tempera-tura ambiente durante 4 meses. O filtrado constituía o antígeno. Este foi empregado na diluição a 1:1000 em solução fisiológica. Não foi padronizado antes de sua utilização.

B — Pacientes

Foram utilizados 100 pacientes de para-coccidioidomicose diagnosticados através de métodos microbiológicos além do diagnóstico clínico. Grande parte era constituída de pa-cientes internados no Hospital das Clínicas portadores de formas disseminadas da molés-tia. Tais pacientes não estavam sob ação de corticoesteróides quando submetidos às pro-vas intradérmicas. Alguns pacientes eram de ambulatório, portadores de formas mais be-nígnas e outros estavam clinicamente cura-dos.

C — Reação intradérmica

Injeção de 0,1 ml da diluição adequada de cada antígeno por via intradérmica, duas na face anterior do antebraço D e duas na face anterior do antebraço E, distanciadas no mínimo 8 cm uma da outra. Leitura após 24 e 48 horas. Consideramos como reação positiva toda aquela que apresentou pápula eritematosa com 5 mm ou mais nos seus diâ-metros, quer à leitura de 24 h quer à leitura de 48 h.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão referidos no Quadro I.

QUADRO I

Reações intradérmicas a quatro antígenos dife-rentes, dois homólogos e dois heterólogos em 100 pacientes de paracoccidioidomicose

Antígenos	Positividade (%)
Paracoccidioidina-polissacáride ..	77,0
Paracoccidioidina-filtrado	67,0
Histoplasmina	24,0
Histoplasmina- <i>duboisii</i>	24,0

A reação à paracoccidioidina foi positiva isoladamente com o antígeno paracoccidioidina-polissacáride em 13% dos casos e com antígeno paracoccidioidina-filtrado em 3% dos casos. Houve concordância de resultados positivos com os dois antígenos em 64% e de resultados negativos em 20% dos pacien-tes.

A reação mais intensamente positiva ao antígeno paracoccidioidina-polissacáride reve-lou pápula eritematosa de 70 x 40 mm à lei-tura de 24 horas, sendo que a prova com antígeno paracoccidioidina-filtrado no mesmo paciente revelou pápula eritematosa de 20 x 20 mm também à leitura de 24 h.

A reação mais intensamente positiva com o antígeno paracoccidiodina-filtrado foi obtida à leitura de 24 h com pápula eritematosa de 60 x 40 mm. O mesmo paciente revelou reação positiva ao antígeno paracoccidiodina-polissacáride com pápula eritematosa também de 60 x 40 mm à leitura de 24 h.

Tanto para um antígeno como para o outro a leitura de 24 horas se revelou mais sensível não sendo raras as provas que positivas às 24 h se negativaram às 48 horas.

Só eventualmente reação negativa às 24 h se tornou positiva às 48 horas sendo tal ocorrência verificada somente com a reação à histoplasmina.

DISCUSSÃO

A positividade de 77% obtida com a paracoccidiodina-polissacáride não reproduziu os resultados de FAVA NETTO & RAPHAEL³. Tal fato poderá encontrar sua explicação na circunstância de que, na presente pesquisa, a maioria dos pacientes era de casos mais graves que se encontravam internados no Hospital das Clínicas. É fato comprovado que muitos pacientes com forma disseminada da moléstia apresentam deficiência em sua imunidade celular, responsável pela hipersensibilidade do tipo tardio. Desde a publicação de FAVA NETTO & RAPHAEL³ numerosas partidas de antígeno polissacarídico foram preparadas. Certamente seria muito trabalhoso ter que padronizar cada nova partida de antígeno em pacientes da moléstia ou em animais experimentalmente infectados, para a realização da prova intradérmica. Por outro lado, sem a padronização do antígeno não se pode esperar a reprodutibilidade da prova intradérmica quanto à sua positividade. Para obviar tal dificuldade a padronização de um novo antígeno pode ser conseguida pela realização de provas simultâneas do novo antígeno comparativamente ao antígeno já padronizado. Este foi o método que utilizamos em várias partidas de antígeno. Verificamos após a experimentação com várias partidas do antígeno polissacarídico que a diluição a ser empregada na prova intradérmica correspondia a 1/10 daquela que representava a dose ótima do antígeno para

fixar 3 unidades (H 50%) de complemento na prova de fixação do complemento. Assim, quando a dose ótima de antígeno a ser empregada para fixar 3 unidades de complemento era representada pela diluição a 1/100, a diluição do mesmo antígeno para sua utilização na prova intradérmica era de 1/10. Esta verificação nos permitiu a utilização da paracoccidiodina-polissacáride tomando por referência a diluição. Na maior parte das partidas a diluição de 1:10 foi a utilizada na realização da prova intradérmica porque o poder fixador ótimo para 3 unidades de complemento (H 50%) estava representada pela diluição 1:100.

O antígeno polissacarídico que utilizamos também pode ser precipitado e reprecipitado pelo álcool, dessecado e empregado em dose padronizada pelo peso, na realização da prova intradérmica. No entanto, quando se padroniza o antígeno pelo peso, é preciso considerar que a substância ativa, responsável pela resposta de tipo tardio na reação intradérmica, pode constituir somente parte daquilo que é pesado. Daí considerarmos que a padronização de um antígeno por diluição é tão válida quanto àquela por peso.

A padronização da dose a ser empregada na reação intradérmica podendo ser feita com referência à dose que representa o poder fixador ótimo do antígeno na prova de fixação do complemento, vem simplificar o trabalho.

A comparação realizada na presente pesquisa demonstrou que o antígeno paracoccidiodina-polissacáride revelou maior índice de positividade que a paracoccidiodina-filtrado. Este último antígeno utilizado na dose de 20 µg em cada prova intradérmica não apresenta sensibilidade igual à paracoccidiodina polissacáride nos pacientes de paracoccidiodomicose.

O índice de positividade (24%) obtido para a prova de histoplasmina não difere daquele que é encontrado na população normal do Estado de São Paulo (LACAZ & col.⁹). A utilização da histoplasmina a 1:1000, se demonstrou adequada por comparação com histoplasmina padronizada, tanto nos inquê-

ritos epidemiológicos quanto em pacientes de histoplasmose epidêmica que tivemos a oportunidade de estudar. Convém registrar que obtivemos histoplasmina tão ativa a partir de uma única amostra de *Histoplasma capsulatum*.

É interessante assinalar também o fato de não termos observado qualquer diferença entre a histoplasmina clássica e a histoplasmina "duboisii", esta última também preparada a partir de uma única amostra de *Histoplasma duboisii*.

Finalmente queremos chamar a atenção para o fato de que a positividade de 24% para a reação da histoplasmina sendo igual àquela que se observa na população normal em nossa área geográfica (LACAZ & col.⁹) parece indicar que não existem reações cruzadas à histoplasmina em pacientes de paracoccidiodomicose. Em nossos pacientes de histoplasmose epidêmica, obtivemos 100% de reações positivas à paracoccidiodina indicando que as reações cruzadas à paracoccidiodina estão presentes nestes casos de histoplasmose (FAVA NETTO & col.⁵).

SUMMARY

Contribution to the immunology of paracoccidiodomycosis. Intradermic tests in patients with two homologous and two heterologous antigens

Simultaneous intradermic tests were done with four different antigens: paracoccidiodin polysaccharide, paracoccidiodin filtrate, histoplasmin and histoplasmin "duboisii" in 100 paracoccidiodomycotic patients.

The experiment was undertaken in order to compare each other the two antigens of *Paracoccidiodines brasiliensis* which were standardized and are commonly used for intradermic tests: to compare histoplasmin with histoplasmin "duboisii" and to study the cross reaction to the histoplasmins in paracoccidiodomycotic patients.

The positivity obtained was of 77% for the paracoccidiodin polysaccharide, 67% for the paracoccidiodin filtrate and 24% for both histoplasmins.

AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem a assistência técnica do Sr. Victor Salcedo Vegas, Técnico de Laboratório.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBORNOZ, M.C.B. & ALBORNOZ, R. — Estudio de la sensibilidad específica en residentes de un área endémica a la paracoccidiodomycosis en Venezuela. *Mycopath. et Mycol. Appl.* 45:65-75, 1971.
2. BARBOSA, W. — *Blastomicose sul-americana. Contribuição ao seu estudo no Estado de Goiás*. [Tese de docência-livre]. Faculdade de Medicina da U.F.G., 1968.
3. FAVA NETTO, C. & RAPHAEL, A. — A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidiodines brasiliensis* na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 3:161-165, 1951.
4. FAVA NETTO, C.; SILVA, U.A.; CHAMMAS, F. & LACAZ, C. da S. — Histoplasmose epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:222-232, 1967.
5. FAVA NETTO, C.; GUERRA, M.A.G. & COSTA, E.O. — Histoplasmose epidêmica. Novos surtos ocorridos no Litoral norte do Estado de São Paulo (Em publicação).
6. GREER, D.L.; ESTRADA, D.C. & TREJOS, L.A. — Dermal reactions to paracoccidiodin among family members of patients with paracoccidiodomycosis. *Proc. First Pan Amer. Symposium PAHO-WHO*, 1972.
7. HOUNIE, P. & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R.C. — Encuesta sobre la sensibilidad al agente de la blastomicosis sudamericana. *An. Fac. Med. Montevideo* 42:27-32, 1957.
8. LACAZ, C. da S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA NETTO, C. & MACARRON, B. — Contribuição para o estudo da blastomicose infecção: inquérito com paracoccidiodina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidiodino positivos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 1:245-259, 1959.
9. LACAZ, C. da S.; PADIM, M.V. & MINAMI, P.S. — Reações à histoplasmina em dois povoados brasileiros: Arraias (Estado de Goiás) e Conceição do Araguaia (Estado do Pará). *Hospital (Rio)* 71:97-100, 1967.

FAVA NETTO, C.; GUERRA, M. A. G. & COSTA, E. O. da — Contribuição ao estudo imunológico da paracoccidiodomicose. Reações intradérmicas em pacientes com dois antígenos homólogos e dois heterólogos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:186-190, 1976.

10. LIMA, P.D.C. — Inquérito epidemiológico de blastomicose sul-americana e histoplasmose no Rio Grande do Norte. Trabalho apresentado no X Congresso da Soc. Brasil. de Medicina Tropical, Curitiba, 1974.
11. MACKINNON, J.E.; ARTÁGAVEYTIA-ALLENDE, R.C. & ARROYO, L. — Sobre la especificidad de la intradermorreacción con paracoccidiodina. *An. Fac. Med. (Montevideo)* 38:363-382, 1953.
12. MOTA, C.C.S. — Contribuição ao estudo da epidemiologia da blastomicose sul-americana no Paraná. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Paraná* 9-10:53-92, 1966-1967.
13. RESTREPO, A. & SCHNEIDAU, J.D. — Nature of the skin reactive principle in culture filtrates prepared from *Paracoccidoides brasiliensis*. *J. Bact.* 93:1741-1748, 1967.
14. RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; OSPINA, S.; RESTREPO, M. & CORREA, A. — Distribution of paracoccidiodin sensitivity in Colombia. *J. Trop. Med. & Hyg.* 17:25-37, 1968.
15. SMITH, C.E.; WHITING, E.G.; BAKER, E.E.; ROSEMBERGER, H.G.; BEARD R. R. & SAITO, M.T. — The use of coccidiodin. *Amer. Rev. Tuberc. (Abstracts)* 57: 330-360, 1948.

Recebido para publicação em 6/2/1975.