

## CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE I — POSSÍVEL PAPEL EPIDEMIOLÓGICO DOS CÃES. ESTUDO SOROLÓGICO E ANATOMO-PATOLÓGICO

Eduardo do Nascimento MÓS<sup>(1)</sup> e Celeste FAVA NETTO<sup>(2)</sup>

### RESUMO

Foram examinados, através da reação de precipitação em tubos e reação de fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER, padronizada para a paracoccidioidomicose por FAVA NETTO<sup>8,9</sup>, soros de 145 cães, 113 procedentes da Capital e 32 da Cidade de Botucatu. A reação de fixação do complemento foi positiva para 74,33% e 78,12%, respectivamente, dos cães da Capital e de Botucatu. A reação de precipitação foi positiva em um único animal. Trinta e sete cães, deste inquérito epidemiológico, foram necropsiados e não se pôde demonstrar através de exame microscópico direto, culturas e estudo histopatológico, a presença de lesões e/ou do *Paracoccidioides brasiliensis* em cães que apresentaram os maiores títulos em anticorpos fixadores do complemento.

### INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose, também denominada blastomicose sul-americana ou doença de LUTZ-SPLENDRE & ALMEIDA, é endêmica em nosso país. Sob a forma de "micose-infeção" ocorre em 14% dos habitantes adultos da Capital e em 25% dos residentes no interior do Estado de São Paulo, segundo FAVA NETTO & RAPHAEL<sup>10</sup>. Sob a forma de "micose-doença" ela é também freqüente, assumindo ora a forma benigna localizada, ora apresentando-se sob a forma disseminada ou grave, levando muitas vezes os pacientes à morte.

A epidemiologia da blastomicose sul-americana apresenta ainda muitos pontos obscuros. Assim, o "habitat" do fungo só recentemente vem sendo descrito com os trabalhos de NEGRONI<sup>24</sup> e de ALBORNOZ<sup>1</sup>

Pouco se sabe sobre os depositários animais (GROSE & TRAMSITT<sup>15</sup>) do *P. brasiliensis*, que poderiam constituir fonte de infec-

ção direta para o homem através da criação de microfocos infecciosos. Existem algumas indicações como as de CONTI-DÍAZ<sup>5</sup>, que tornam desejáveis pesquisas mais pormenorizadas, para eventual esclarecimento do assunto.

A blastomicose norte-americana, que apresenta muita semelhança com a paracoccidioidomicose, ocorre em cães, fato já assinalado por diversos Autores<sup>2, 3, 4, 6, 7, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34</sup>. Em 1970, FURCOLOW & col.<sup>13</sup> analisaram 384 casos caninos de blastomicose norte-americana.

Nosso interesse para a possível ocorrência da paracoccidioidomicose em cães, foi despertado há vários anos pela verificação, feita no Laboratório de Sorologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P., de reações sorológicas de fixação do complemento positivas no soro de cães capturados nas ruas da

(1) Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

(2) Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P., São Paulo, Brasil

Capital. Os resultados aqui relatados constituem parte daqueles que serviram para que um de nós (Eduardo do Nascimento Mós) realizasse sua tese de doutoramento.

#### MATERIAL E MÉTODOS

1. *Cães* — Foram analisados 145 cães: 113 da Capital e 32 da cidade de Botucatu. Todos os animais foram fichados com anotação da idade aproximada, raça, sexo, pelagem e condições de saúde. Os animais foram sangrados, por via arterial para evitar hemólise, retirando-se em condições estéreis 20 ml de sangue de cada animal. Os tubos de coleta foram mantidos à temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas e depois colocados na geladeira a 2-4°C até o dia seguinte, quando os soros eram separados esterilmente. Os soros eram então conservados a -20°C até o momento do uso, e então inativados a 56°C durante 30 minutos.

2. *Reação de fixação do complemento* — Realizada pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>32</sup>, padronizada por FAVA NETTO<sup>8,9</sup> para o sistema paracoccidiodomicose, utilizando, como antígeno, polissacarídeo extraído de células leveduriformes de várias amostras de *Paracoccidoides brasiliensis*.

3. *Reação de precipitação* — Realizada em tubos de ensaio, de acordo com a técnica descrita por FAVA NETTO<sup>8</sup> e utilizando, como antígeno, o mesmo polissacarídeo.

4. *Exame anátomo-patológico* — Os animais que revelaram resultados positivos nas reações sorológicas (reação de precipitação positiva ou título superior a 10 na reação de fixação do complemento), foram sacrificados por choque elétrico e necropsiados. Foram colhidos fragmentos dos órgãos que apresentavam lesões suspeitas. Parte do material assim coletado, era destinada ao exame histopatológico e submetida à fixação em formol neutro a 10% e em líquido de Bouin. O exame histopatológico foi feito corando-se as lâminas pela Hematoxilina-eosina e P.A.S.

5. *Exame microscópico direto* — Todos os materiais colhidos de lesões suspeitas durante as necrópsias foram submetidos a exame microscópico direto.

6. *Culturas* — De todos os órgãos dos quais se coletaram amostras para exames microscópico direto e histopatológico foram também colhidos fragmentos para tentativa de isolamento do *Paracoccidoides brasiliensis*. Os fragmentos de órgãos eram colocados em tubos estéreis contendo areia fina, adicionados de pequeno volume de solução fisiológica estéril e triturados com auxílio de bastão de vidro. Em seguida, da suspensão obtida eram retiradas alíquotas e semeadas em meios adequados ao isolamento de *P. brasiliensis*:

- 1) Ágar Sabouraud-dextrose (Difco), mais cloranfenicol na dose de 0,10 mg/ml, em tubos de 15 x 160 mm, contendo aproximadamente 10 ml de meio para cada tubo;
- 2) Caldo Sabouraud-dextrose (Difco), mais cloranfenicol na dose de 0,10 mg/ml, em frascos de Erlenmeyr de 100 ml contendo 50 ml de meio;
- 3) Meio de Proteose-peptona, conforme proposto por FAVA NETTO<sup>9</sup>. Tais meios foram incubados a 37°C e à temperatura ambiente.

#### RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo sorológico de 145 cães (113 provenientes da Capital e 32 de Botucatu) encontram-se referidos nas Tabelas I e II.

Verifica-se por tais dados, que 109 cães deram resultados positivos à reação de fixação do complemento, enquanto que, somente um revelou reação de precipitação positiva.

A reação de fixação do complemento foi positiva em 74,33% dos cães provenientes da Capital e em 78,12% daqueles oriundos de Botucatu.

Os títulos obtidos através da reação de fixação do complemento, variaram amplamente nos soros dos diferentes animais, indo de

2,0 que é o limite de positividade, a 250, título este encontrado no soro do cão n.º 96.

A reação de precipitação positiva se verificou no soro de cão que apresentava título igual a 2 pela reação de fixação do complemento.

Não se conseguiu demonstrar a presença do *P. brasiliensis*, quer pelo exame microscópico direto, quer pelas culturas realizadas a partir de fragmentos de órgãos suspeitos dos animais que foram necropsiados (em número de 37).

TABELA I

Resultados dos exames sorológicos de 145 soros de cães procedentes dos Municípios de São Paulo (1 a 113) e de Botucatu, Estado de São Paulo (114 a 145). São Paulo, 1972

N.º	RFC	PP	N.º	RFC	PP	N.º	RFC	PP	N.º	RFC	PP
1	10,0	—	38	29,0	—	75	9,0	—	112	2,1	—
2	2,1	—	39	—	—	76	13,5	—	113	—	—
3	17,0	—	40	—	—	77	27,0	—	114	2,3	—
4	2,9	—	41	3,0	—	78	3,0	—	115	39,0	—
5	2,0	—	42	—	—	79	—	—	116	36,0	—
6	2,6	—	43	—	—	80	—	—	117	26,0	—
7	5,0	—	44	—	—	81	—	—	118	40,0	—
8	3,6	—	45	—	—	82	—	—	119	16,5	—
9	10,0	—	46	—	—	83	4,7	—	120	32,0	—
10	2,3	—	47	—	—	84	5,3	—	121	7,0	—
11	3,0	—	48	—	—	85	2,1	—	122	25,0	—
12	8,0	—	49	2,6	—	86	4,6	—	123	8,0	—
13	3,0	—	50	2,8	—	87	—	—	124	4,8	—
14	125,0	—	51	2,2	—	88	2,7	—	125	24,0	—
15	5,0	—	52	3,2	—	89	2,3	—	126	16,0	—
16	17,0	—	53	3,0	—	90	—	—	127	14,0	—
17	3,7	—	54	2,0	—	91	25,0	—	128	8,0	—
18	—	—	55	2,6	—	92	8,0	—	129	5,0	—
19	8,0	—	56	3,0	—	93	26,0	—	130	36,0	—
20	17,0	—	57	5,0	—	94	36,0	—	131	16,0	—
21	7,0	—	58	2,6	—	95	26,0	—	132	27,0	—
22	7,6	—	59	3,0	—	96	250,0	—	133	83,0	—
23	7,0	—	60	—	—	97	—	—	134	22,0	—
24	7,0	—	61	4,8	—	98	7,8	—	135	—	—
25	2,0	++	62	3,2	—	99	—	—	136	—	—
26	2,3	—	63	3,2	—	100	—	—	137	5,0	—
27	7,0	—	64	5,0	—	101	7,3	—	138	6,0	—
28	17,0	—	65	5,0	—	102	5,1	—	139	—	—
29	3,5	—	66	2,7	—	103	—	—	140	—	—
30	9,5	—	67	2,8	—	104	—	—	141	—	—
31	—	—	68	3,3	—	105	3,6	—	142	—	—
32	14,0	—	69	2,8	—	106	—	—	143	207,0	—
33	27,0	—	70	3,0	—	107	—	—	144	9,0	—
34	15,0	—	71	8,0	—	108	—	—	145	—	—
35	15,0	—	72	3,0	—	109	—	—			
36	16,0	—	73	2,7	—	110	—	—			
37	3,0	—	74	2,1	—	111	3,0	—			

N.º — Número do cão

RFC — Título da reação de fixação do complemento

PP — Resultado da reação de precipitação

TABELA II

Resultados dos exames sorológicos de 145 cães, procedentes do Estado de São Paulo

Soros		Fixação do complemento		Reação de precipitação	
N.º	Procedência	Pos.	%	Pos.	%
113	São Paulo (SP)	84	74,33	1	0,88
32	Botucatu (SP)	25	78,12	0	0,00
145	Estado de São Paulo	109	75,17	1	0,069

As lesões anátomo-patológicas verificadas em alguns fragmentos, principalmente em gânglios mediastínicos e mesentéricos, correspondiam ao quadro de hiperplasia dos folicúlos linfóides.

Não foram verificadas lesões que pudessem sugerir a infecção por *P. brasiliensis*.

#### DISCUSSÃO

Os resultados aqui referidos chamam a atenção para o alto índice de positividade da reação de fixação do complemento e a ausência de anticorpos precipitantes na quase totalidade dos mesmos soros, reagindo contra o mesmo antígeno polissacarídico extraído de células leveduriformes de várias amostras de *Paracoccidoides brasiliensis*. Ainda mais, tais resultados foram obtidos em animais que submetidos à necrópsia não revelaram a presença do *P. brasiliensis*, quer ao exame direto, quer através das culturas adequadamente conduzidas, nem a presença de lesões histológicas, condizentes com blastomicose sul-americana.

A conclusão, que se poderia impor, de ser a reação de fixação do complemento, tal como realizada na presente pesquisa, inespecífica quando são utilizados soros de cães, não nos parece comprovada. Assim, como explicar as reações negativas em soros de muitos cães e como explicar o nível tão variável nos títulos obtidos nos diferentes cães? Se houvesse no soro de cães alguma globulina capaz de reagir com o antígeno polissaca-

rídico e assim fixar o complemento, sem se tratar de anticorpo, seria de esperar resultados positivos em todos os cães e com nível talvez homogêneo dos títulos e não com a ampla variação verificada.

Em trabalho que os mesmos Autores publicarão em seguida, verificar-se-á que a reatividade sorológica por fixação do complemento, surge em cães originalmente negativos após infecção experimental com *Paracoccidoides brasiliensis*.

Quando se considera a semelhança da paracoccidiodomicose com a blastomicose norte-americana, no que se refere à epidemiologia, à patogenia, às lesões anátomo-patológicas e aos agentes etiológicos e conhecendo-se a alta incidência dessa moléstia em cães, como foi referido na introdução, não será de admirar que venha a ser demonstrada também a paracoccidiodomicose nestes animais. Pensamos que os resultados deste inquérito epidemiológico através da sorologia podem vir a estimular novos estudos visando a demonstração da paracoccidiodomicose em cães.

#### SUMMARY

*Contribution to the study of Paracoccidiodomycosis. I — Possible contribution of the dog in its epidemiology. A serological and anatomico-pathological study*

In an epidemiological survey, by the precipitin reaction in tubes and WADSWORTH, MALTANER & MALTANER complement fixa-

tion reaction, as standardized by FAVA NETTO<sup>8,9</sup> for the study of paracoccidiodomycosis, was carried out with the sera of 145 dogs, 113 from the Capital and 32 from Botucatu City.

The complement fixation reaction was positive in 74.33% and in 78.12% of the sera from São Paulo and Botucatu respectively. The precipitin reaction was negative in all but one of the sera.

From this group of animals, 37 dogs were submitted to necropsy and it was not possible to demonstrate the presence of histopathological lesions or the *P. brasiliensis* by direct microscopic examination and cultures from organ fragments from the dogs that exhibited high titers in the complement fixation test.

#### A G R A D E C I M E N T O S

Os Autores agradecem o auxílio prestado por Dona Ida Mello Sciannaméa e Victor Salcedo Vega, técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBORNOZ, M. B. — Isolation of *Paracoccidiodioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Paracoccidiodomycosis Proceed. First Pan Amer. Symposium/Medellin, Colombia*, pp. 71-75, 1972.
2. ANTHONY, C. N. — Canine blastomycosis: a case report. *Jensal. J.* 28:22, 1945.
3. AUSERMAN, R. J.; SUTTON, H. H. & OAKS, J. T. — Clinical signs of blastomycosis in dogs. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 130:541-542, 1957.
4. BADAME, F. G. & PECK, G. K. — Blastomycosis in a dog. *Canad. Vet. J.* 1:177, 1960.
5. CONTI-DÍAZ, I. A. — Skin tests with Paracoccidiodin and their importance. *Paracoccidiodomycosis. Proceed. First Pan Amer. Symposium/Medellin, Colombia*, pp. 197-202, 1972.
6. DITCHFIELD, W. J. B. & FISHER, J. B. — North American blastomycosis in the dog, with a report of six canadian cases. *Canad. Vet. J.* 2:103-111, 1961.
7. FATTAL, A. R.; SCHWARZ, J. & STRAUB, M. — Isolation of *Histoplasma capsulatum* from lymphonodes of spontaneous by infected dogs. *Amer. J. Clin. Path.* 36:119-124, 1961.
8. FAVA NETTO, C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (São Paulo)* 21:88-194, 1961.
9. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polisacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.* 18:197-254, 1955.
10. FAVA NETTO, C. & RAPHAEL, A. — A reação intradérmica com polissacaride do *Paracoccidiodioides brasiliensis* na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Méd. trop. São Paulo* 3:161-165, 1961.
11. FOSHAY, L. & MADEEN, A. G. — The dog as a natural host for *Blastomyces dermatitidis*. *Amer. J. Trop. Med.* 22:565-569, 1942.
12. FURCOLOW, M. L.; CHICK, E. W.; BUSEY, J. F. & MENGES, R. W. — Prevalence and incidence studies of human and canine blastomycosis. I — Cases in the United States, 1885-1968. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 102:60-67, 1970.
13. FURCOLOW, M. L.; BUSEY, J. F.; MENGES, R. W. & CHICK, E. W. — Prevalence and incidence studies of human and canine blastomycosis. II — Yearly incidence studies in three selected states, 1960-1967. *Amer. J. Epidemiol.* 92:121-131, 1970.
14. GRICE, H. C.; BALAZS, T. & HUTCHINSON, J. A. — North American blastomycosis. A report of two cases in dogs. *Canad. Vet. J.* 2:221-225, 1961.
15. GROSE, E. & TRAMSITT, J. R. — *Paracoccidiodioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus literratus*) in Colombia S. A. *Sabouraudia* 4: 124-125, 1965.
16. HELPER, L. J. & GREENSPAN, C. — Canine blastomycosis. *Illinois Vet.* 6:38-41, 1963.
17. KNECHT, C. D. — North American blastomycosis. A case report. *Maryland Vet.* 5: 5-8, 1963.
18. LACROIX, L. J.; RISER, W. H. & KARLSON, A. G. — Blastomycosis in the dog.

MÓIS, E. do N. & FAVA NETTO, C. — Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I — Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorológico e anátomo-patológico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 16:154-159, 1974.

- A case report. *N. Amer. Vet.* 28:603-606, 1947.
19. MACLANE, C. C. — Cases of generalized fatal blastomycosis, including one in a dog. *J. Infect. Dis.* 19:194-208, 1916.
20. MADSEN, D. E. — Some of three pathogenic fungi isolated from animals. *Cornell Vet.* 32:383-389, 1942.
21. MENGES, R. W. — Blastomycosis in animals. A review of an analysis of 116 canine cases. *Vet. Med.* 55:45-54, 1960.
22. MENGES, R. W.; McCLEAN, J. T. & AUSHERMAN, R. J. — Canine histoplasmosis and blastomycosis in Lexington, Kentucky. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 124:202-207, 1954.
23. MEYER, F. K. — Blastomycosis in dogs. *Proc. Path. Soc. Philad.* 15:10, 1912.
24. NEGRONI, P. — El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. *Prensa Med. Argent.* 3:2381-2382, 1966.
25. RAMSEY, F. K. & CARTER, G. R. — Canine blastomycosis in United States. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 120:93-98, 1952.
26. ROBINSON, B. B. & SCHELL, F. G. — Blastomycosis in a dog. A case report. *N. Amer. Vet.* 32:555-558, 1951.
27. SAUNDERS, L. A. — Cutaneous blastomycosis in the dog. A case report. *N. Amer. Vet.* 29:650-652, 1948.
28. SAVAGE, A.; BOYCOTT, B. R. & VILLA, L. J. — North American blastomycosis in a dog. *Canad. Vet. J.* 3:260-262, 1962.
29. SCHWARTZMANN, R. M.; FUSARO, R. M. & ORKIN, M. — Transmission of North American blastomycosis. Possible case of transmission from dog to human. *J. Amer. Med. Ass.* 171:107-111, 1959.
30. SEIBOLD, H. R. — Systemic blastomycosis in dogs: a report two cases. *N. Amer. Vet.* 27:162-164, 1946.
31. STANGER, N. E. & MARTIN, E. — North American blastomycosis in a dog. *Canad. Vet. J.* 4:299-300, 1963.
32. WADSWORTH, A. B. — *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health.* Albany, Williams & Wilkins, 1947, pp. 357-387.
33. WHITE, T. — Blastomycosis in a dog. *Iowa St. Coll. Vet.* 20:32, 1958.
34. WOLF, G. F. — Blastomycosis in dog: Two cases with ocular manifestation. *Vet. Med.* 53:595-600, 1958.

Recebido para publicação em 6/8/1973.