

ANTÍGENO POLISSACARÍDICO DO *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS* ESTUDO DO TEMPO DE CULTIVO DO *P. BRASILIENSIS*, NECESSÁRIO AO PREPARO DO ANTÍGENO

Celeste FAVA NETTO ⁽¹⁾, Victor Salcedo VEGAS ⁽²⁾, Ida Mello SCIANNAMÉA ⁽²⁾
e Dante Brazil GUARNIERI ⁽²⁾

RESUMO

No presente trabalho os Autores descrevem em detalhes, a técnica de preparo do antígeno polissacarídico do *P. brasiliensis*, como vem sendo executada há 15 anos, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Após estudarem quatro amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, cultivadas a 37°C por períodos de tempo de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias, concluem que o antígeno polissacarídico pode ser obtido a partir das células leveduriformes cultivadas, durante 20 dias, a 37°C.

INTRODUÇÃO

FAVA NETTO ³ descreveu a técnica de preparo do antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Tratava-se de modificação da técnica utilizada por NORDÉN ⁶ para obter antígeno polissacarídico do *Sporotrichum schenckii*. Tal modificação da técnica de preparo de antígeno polissacarídico, permitiu a obtenção de antígeno com alto poder fixador, adequado para ser empregado nas reações de fixação do complemento pelas técnicas de WADSWORTH & col. ⁹ e de STEIN & VAN NGU ⁷.

Posteriormente, FAVA NETTO ⁴ demonstrou que o mesmo antígeno podia ser empregado em reações de precipitação, realizadas em tubos e FAVA NETTO & RAPHAEL ⁵ padronizaram seu emprego na realização de provas intradérmicas de hipersensibilidade tipo tardio.

Tal antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis* tem sido preparado a par-

tir de várias amostras do cogumelo, apesar de FAVA NETTO ⁴ ter demonstrado que, oito amostras liberavam o mesmo tipo de antígeno, se bem que, em quantidades diferentes. O tempo de cultivo das amostras foi sempre de aproximadamente, 60 dias, a 37°C. A mesma técnica tem sido por nós empregada, com sucesso, na obtenção de antígeno polissacarídico a partir de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporotrichum schenckii* e *Candida albicans*. Faltava estudo sistemático na determinação do tempo de cultivo mais adequado na obtenção do antígeno polissacarídico do *P. brasiliensis*. É o que os Autores apresentam na presente investigação.

Por estarem há muito tempo esgotadas as separatas do trabalho de FAVA NETTO ³ e por serem muitas as solicitações, os Autores descrevem aqui, em detalhes, a técnica empregada na obtenção do antígeno polissacarídico.

Os trabalhos sobre Imunologia das micoses na Secção de Sorologia são parcialmente subvencionados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Trabalho do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Carlos da Silva Lacaz)

- (1) Professor associado de Microbiologia e Imunologia
(2) Técnicos de Laboratório

MATERIAL E MÉTODOS

1) *Meio de cultura* — O meio de cultura proposto por FAVA NETTO³ apresentava a seguinte composição:

Proteose peptona n.º 3 (Difco) ..	3,0 g
Peptona (Difco)	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar (Difco)	18,0 g
Água destilada	1.000 ml

pH = 7,2 — 7,4

Atualmente, substituindo o extrato de levedura, acrescentamos por litro de meio de cultura uma ampola do seguinte complexo vitamínico:

Cloridrato de tiamina	1,0 mg
Niacina	1,0 mg
Pantotenato de Ca	1,0 mg
Riboflavina	0,5 mg
Inositol	5,0 mg

O complexo vitamínico é acrescentado ao meio de cultura já esterilizado e esfriado entre 40-50°C sendo então distribuído esterilmente e deixado solidificar.

2) *Preparo do antígeno* — Após o crescimento adequado do *Paracoccidioides brasiliensis*, em sua fase leveduriforme, a 37°C no meio referido, proceder como segue: a) Suspender as células leveduriformes com o auxílio de pequena espátula, emulsionando-as em solução fisiológica tamponada com Veronal, em tubo de ensaio; b) Agitar bem para homogeneizar e centrifugar a 2.000 r/m durante 10 minutos. Abandonar o sobrenadante; c) Suspender o sedimento em aproximadamente, cinco volumes de acetona, agitando com auxílio de bastão para levantar completamente o sedimento. Centrifugar, abandonar o sobrenadante. Repetir a operação mais duas vezes; d) Procedendo do mesmo modo lavar o sedimento três vezes com éter sulfúrico; e) Depois da última centrifugação, que deve ser feita por 20 minutos a 2.000 r/m, anotar o volume das células úmidas. Deixar o sedimento em geladeira até o dia seguinte, quando as células estarão secas; f) Levando-se em conta o volume das

células úmidas, proceder suspensão a 15% em tampão de Veronal. Homogeneizar bem; g) Autoclavar a 120°C durante 20 minutos; h) Centrifugar a 2.000 r/m durante 30 minutos; i) O sobrenadante, separado e conservado esterilmente, constitui o antígeno polissacarídico. Nota: No preparo do antígeno usamos o tampão de Veronal sem gelatina.

O antígeno pode ser conservado em condições de esterilidade, em geladeira, sem perder suas propriedades, durante vários anos. Pode ser distribuído em frascos tipo penicilina, em pequenos volumes. Dai serão retiradas as alíquotas para uso, sempre preservando-se a esterilidade. O mertiolato a 1:10.000 pode ser acrescentado como preservativo.

No presente trabalho preparamos o antígeno polissacarídico, como acima descrito, a partir de quatro amostras diferentes de *P. brasiliensis*. De cada amostra foram preparados seis partidas diferentes do antígeno após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de cultivo.

3) *Titulação do antígeno* — FAVA NETTO³ estudou as condições necessárias para o emprego do antígeno polissacarídico do *P. brasiliensis* nas reações de fixação do complemento pelas técnicas de WADSWORTH & col. e de STEIN & VAN NGU. Para a primeira técnica, foram determinados os fatores de conversão, necessários ao cálculo do título aproximado do soro na reação quantitativa com 3 e 6 Unidades (50% de hemólise) de complemento. Posteriormente, FAVA NETTO⁴ demonstrou que as curvas de isofixação (segundo ALMEIDA¹), para o sistema blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico, eram do tipo 1. Nestas condições o antígeno pode ser utilizado em excesso nas reações quantitativas, sem prejudicar a sensibilidade das mesmas.

No entanto, das titulações cruzadas, realizadas fazendo-se reagir numerosas diluições do antígeno contra numerosas diluições do soro positivo, de onde são obtidos os dados para as curvas de isofixação, pode-se obter o poder “fixador ótimo do antígeno”. Chama-se “poder fixador ótimo” àquela quantidade de antígeno que revela maior título para o soro positivo, com determinada quantidade de complemento. Para cada nova partida de antígeno determinamos o seu “poder fixador ótimo” com 3 e 6 Unidades (50% de hemó-

lise) de complemento. São estas quantidades que utilizamos nas reações quantitativas, para a determinação aproximada do título do sôro, na reação segundo WADSWORTH, MALTANER & MALTANER.

Nossa experiência, de 15 anos, preparando numerosas partidas de antígeno e utilizando sempre testemunho de sôro positivo (mistura de soros positivos) cada dia em que é realizada a reação, nos indica que as propriedades do antígeno não variaram de uma partida para outra. Há sempre muito boa reprodutibilidade do título do sôro positivo, mesmo quando passamos de uma partida para outra do antígeno.

Devido a êstes motivos consideramos suficiente, na titulação do antígeno, a determinação do seu poder fixador ótimo frente a 3 e 6 Unidades (50% de hemólise) de complemento. Normalmente êle se situa em diluição na qual o antígeno não apresenta qualquer poder anticomplementar.

4) *Hemácias de carneiro* — Utilizamos sempre mistura de hemácias de dois carneiros. O sangue foi colhido em solução de Alsever, em partes iguais. No momento do

uso, as hemácias foram lavadas em solução fisiológica e a suspensão final a 5% foi feita em tampão de Venoral + Ca + Mg + gelatina e padronizada para densidade óptica de 0,54 ou 0,56 em colorímetro foto-elétrico (Evans Electroselenium) com filtro verde amarelado.

5) *Sôro hemolítico* — Preparado em coelhos pela técnica de ULRICH MAC ARTHUR⁸ usado em dose ótima, isto é, naquela concentração em que novos incrementos de hemolisina não determinam maior hemólise, frente a dose constante de complemento.

6) *Solução fisiológica* — Solução de NaCl quimicamente puro, em água destilada a 0,85%.

7) *Solução fisiológica tamponada com Veronal + Ca + Mg + Gelatina* — Preparada de acordo com as especificações fornecidas por BIER².

8) *Sôro positivo* — Mistura de soros de pacientes de blastomicose.

9) *Complemento* — Constituído por mistura de soros de 20-30 cobaios e titulado em unidades 50% de hemólise.

QUADRO I

Titulação cruzada da partida 1 de antígeno obtida da amostra P.T.L.

Diluições do antígeno 1:	Diluições do sôro 1:									A ₁	A ₂
	2	4	8	16	32	64	128	256	512		
20	0	0	10	65	90	100	100	100	100	55	100
40	0	0	10	50	90	100	100	100	100	60	100
80	0	0	0	20	65	90	100	100	100	55	100
160	0	0	5	30	80	100	100	100	100	60	100
320	0	5	15	45	90	100	100	100	100	55	100
640	0	10	20	60	90	100	100	100	100	55	100
S ₁	15	25	45	55	60	65	60	65	65		
S ₂	55	80	90	90	100	100	100	100	100		

A₁ = Antígeno + 1 Unidade de complemento

A₂ = Antígeno + 2 Unidades de complemento

S₁ = Sôro + 1 Unidade de complemento

S₂ = Sôro + 2 Unidades de complemento

10) *Técnica da reação de fixação do complemento* — A reação de fixação do complemento foi realizada de acordo com a técnica de WADSWORTH & col.⁹ com período de incubação primária de 18 horas a 0-4°C conforme determinado por FAVA NETTO³.

RESULTADOS

O Quadro I mostra os resultados da titulação cruzada obtida com a partida 1 de antígeno da amostra P.T.L. e realizada com 3 Unidades (50% de hemólise) de complemento. Pelos resultados obtidos verifica-se que o poder fixador ótimo é representado pela diluição 1:80 do antígeno. Tal antígeno fixaria, portanto, quando não diluído 240 Unidades (50% de hemólise) se considerarmos fixadas 3 Unidades na titulação, para facilidade de cálculo. Se levarmos em conta que o antígeno é empregado na quantidade de 0,1 ml, teríamos que 1 ml de antígeno fixaria 2.400 unidades de complemento.

Para cada partida de antígeno foi, no entanto, feita a determinação do poder fixador ótimo para 3 e 6 Unidades de complemento. De cada titulação foi determinado o título por ml de antígeno e em seguida feita a média, que é referida como título, para cada

QUADRO II

Titulos (Unidades 50% de hemólise, de complemento fixadas por ml de antígeno)

Partida	Dias de cultivo	Amostras			
		265	395	PTL	192
1	10	3000	2250	2400	9000
2	20	3000	7500	2400	9000
3	30	2250	6000	2400	6000
4	40	1100	2250	2400	4500
5	50	750	1100	7200	1500
6	60	300	1800	2400	1500

partida do antígeno obtida das quatro amostras de *P. brasiliensis*.

O Quadro II mostra o relacionamento dos títulos assim obtidos com as amostras de *P. brasiliensis* e o tempo de cultivo. Conforme se verifica pelos resultados do Quadro II não é necessário cultivar as amostras durante 60 dias como vinhamos fazendo para se obter o antígeno polissacarídico.

DISCUSSÃO

Em nossa já longa experiência, de 15 anos, no preparo de antígeno polissacarídico, por autoclavação de suspensão de células leveduriformes do *Paracoccidioides brasiliensis*, sempre cultivamos o fungo por período de tempo de aproximadamente, 60 dias. O meio de cultura que empregamos permite o início do crescimento do cogumelo a 37°C no 4.º ou 5.º dia, sendo que, no 20.º dia o crescimento já é abundante.

Algumas experiências esporádicas, que fizemos no sentido de obter o antígeno com menor tempo de cultivo, deram resultados discordantes. A presente pesquisa foi planejada no sentido de esclarecer este ponto.

Utilizamos quatro amostras diferentes de *P. brasiliensis* e para cada amostra preparamos, seguindo sempre a mesma técnica, seis partidas diferentes de antígeno, após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de cultivo. A titulação de cada partida foi realizada em titulação cruzada com 3 e 6 Unidades de complemento. Para cálculo do título do antígeno de cada partida utilizamos o critério arbitrário de multiplicar a recíproca da diluição que representava o poder fixador ótimo, pela respectiva quantidade de complemento, feita a média dos valores, e multiplicado por 10 para referir o número de unidades (50% de hemólise) de complemento fixadas por 1 ml de antígeno. Tais resultados, assim obtidos, são referidos no Quadro II. A análise de tais resultados nos permite concluir, não ser necessário prolongar o tempo de cultivo, por mais de 20 dias, quando o crescimento do fungo já é abundante, para obter o antígeno polissacarídico.

SUMMARY

The polysaccharidic antigen from Paracoccidioides brasiliensis. Study of the time of cultivation necessary for the preparation of the antigen

In this work it is given a detailed description of the technique for the preparation of the polysaccharidic antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* as it is done in the "Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo" the last 15 years. After the study of four strains of *P. brasiliensis*, cultivated during periods of time of 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days at 37°C, the Authors arrived to the conclusion that the polysaccharidic antigen can be obtained after only 20 days of cultivation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. O. de — Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement fixation tests. *J. Immun.* 76:259-263, 1956.
2. BIER, O. G. — *Bacteriologia e Imunologia. Em suas aplicações à Medicina e à Higiene.* 13.^a edição. São Paulo, Melhoramentos, 1966.
3. FAVA Netto, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clín. Exp.* 18:197-254, 1955.
4. FAVA Netto, C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de LUTZ. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 21:99-194, 1961.
5. FAVA Netto, C. & RAPHAEL, A. — A reação intradérmica com polissacáride de *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 3:161-165, 1961.
6. NORDÉN, A. — Sporotrichosis. Clinical and laboratory features and a serological study in experimental animals and humans. *Acta Path. Microbiol. Scand.* (Suppl. 89), 1951.
7. STEIN, G. J. & VAN NGU, D. — A quantitative complement fixation test: titration of luetic sera by the unit of 50 per cent hemolysis. *J. Immun.* 65:17-37, 1950.
8. ULRICH, C. A. & MAC ARTHUR, F. X. — An improved method for the production of anti-sheep hemolysin. *Amer. J. Clin. Path. Tech.* (Suppl.) 12:84-85, 1942.
9. WADSWORTH, A.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantitative studies of the reaction of complement fixation with syphilitic serum and tissue extract. *J. Immun.* 35:101-115, 1938.

Recebido para publicação em 13/12/1968.