

ESTUDOS ADICIONAIS SÔBRE A PREPARAÇÃO DE ANTIGLOBULINAS MARCADAS PELA FLUORESCÊNCIA PARA A FASE CEREBRIFORME DO *PARACOCCHIDIOIDES BRASILIENSIS*

Manuel E. SILVA (1) e William KAPLAN (2)

RESUMO

Quatro diferentes lotes de globulina anti-*Paracoccidioides brasiliensis* marcadas com isotiocianato de fluoresceína foram preparados.

Os anti-soros para o preparo dos reagentes foram conseguidos por imunização de coelhos com células vivas de *P. brasiliensis*. Dois dos anti-soros foram obtidos por infecção de coelhos normais, enquanto que os dois outros foram produzidos em animais previamente imunizados com células mortas da fase leveduriforme do fungo.

Embora alto título de anticorpos fôsse encontrado nesses conjugados, êsses anticorpos eram comuns a vários outros fungos. Todos os conjugados coraram intensamente as células leveduriformes do *P. brasiliensis* porém mostraram, igualmente, intensas reações cruzadas com as formas tissulares de *Histoplasma capsulatum*, *H. duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Sporotrichum schenckii*, além de outros fungos heterólogos.

A diluição dos conjugados resultou em enfraquecimento das reações com os organismos homólogos, sem, no entanto, remover as reações cruzadas. A adsorção dos reagentes, igualmente, não resultou na obtenção de um conjugado específico para o *P. brasiliensis*, em contraste com estudos anteriores nos quais foram usados anti-soros de coelhos imunizados com células leveduriformes não viáveis da mesma amostra do fungo.

INTRODUÇÃO

O emprêgo das reações de imunofluorescência para identificação de fungos patogênicos tem sido motivo de diversas publicações nos últimos anos.

O preparo de reagentes específicos para a identificação de fungos como o *Coccidioides immitis*⁴, *Cryptococcus neoformans*⁸, *Sporotrichum schenckii*⁵, *Histoplasma capsulatum*⁷ e *Blastomyces dermatitides*⁶ têm sido descrito na literatura. Tais reagentes têm se mostrado de utilidade no diagnóstico das micoses produzidas por êsses fungos.

Recentemente SILVA & KAPLAN¹¹ relataram a obtenção de conjugados específicos para a identificação do *Paracoccidioides brasiliensis* em cultura (fase cerebriforme) e em material proveniente de pacientes de blastomicose sul-americana, usando o método direto. Os anti-soros foram obtidos pela imunização de coelhos com suspensão de células leveduriformes do *P. brasiliensis* mortas pelo formol. Duas diferentes amostras de *P. brasiliensis*, identificadas com os números 453 e 569 foram usadas por aqueles Autores.

Communicable Disease Center, Public Health Service, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, Georgia, U.S.A.

(1) Fundação Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil.

(2) Mycology Unit, Communicable Disease Center, U.S.A.

O conjugado produzido a partir de anti-sôro obtido por imunização de coelhos com a amostra n.º 453 (PB-1), foi adsorvido duas vezes com células de *Sp. schenckii* e uma vez com células de *C. immitis*. O outro conjugado (PB-3) foi adsorvido uma vez, respectivamente, com células dos seguintes fungos: *C. immitis*, *H. capsulatum* e *Rhodotorula sp.* Ambos os reagentes mostraram-se específicos para o *P. brasiliensis*, e, na fase inicial dos estudos, o fungo pode ser evidenciado em material (escarro e secreção purulenta) de 4 pacientes de blastomicose sul-americana. Posteriormente, usando o conjugado PB-1, um dos Autores (W.K.) demonstrou a presença de células do *P. brasiliensis* em material clínico de 4 outros pacientes daquela doença.

Ambos os reagentes não mostraram, no entanto, elevado título de anticorpos específicos; a diluição do conjugado resultou em sensível enfraquecimento das reações.

O presente estudo foi, conseqüentemente, levado a efeito a fim de investigar a possibilidade da produção de um conjugado com título mais alto de anticorpos específicos para o *P. brasiliensis*.

É propósito dêste trabalho relatar os resultados das reações de imunofluorescência praticadas usando-se globulinas anti-*P. brasiliensis* marcadas, a partir de anti-soros preparados por diferentes métodos de imunização.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro diferentes lotes de anti-soros contra células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* (Amostra n.º 453) foram produzidos em dois diferentes grupos de coelhos, e denominados: PB-4, PB-5, PB-6 e PB-7.

As culturas usadas para a preparação da vacina foram cultivadas em meio de KELLEY⁹ a 37°C, durante 6 dias. Depois dêsse período as células foram retiradas do meio, suspensas em solução fisiológica, e a turbidez da suspensão ajustada ao tubo n.º 5 da Escala de McFarland.

O anti-sôro PB-4 foi produzido por injeção endovenosa, em 3 coelhos normais. Cada coelho recebeu uma injeção semanal de 2 ml da vacina, durante 4 semanas conse-

cutivas. Vinte e um dias após a última injeção os animais foram sangrados, e os soros resultantes misturados entre si.

O anti-sôro PB-6 foi obtido dos mesmos coelhos, por sangria aos 41 dias depois da última injeção.

O lote PB-5 foi produzido por infecção de 3 coelhos previamente imunizados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* mortas pelo formol, de acôrdo com a técnica usada para a obtenção do anti-sôro PB-1 descrita em trabalho anterior¹¹. Cinco meses depois da última injeção com a vacina morta os coelhos receberam uma injeção semanal por via endovenosa de 2 ml da suspensão de células vivas, durante 4 semanas. Vinte e um dias após a injeção final os animais foram sangrados e os soros resultantes misturados entre si.

O anti-sôro PB-7 foi obtido dos mesmos animais usados para a produção de PB-5, por sangria aos 41 dias após a última injeção.

As antiglobulinas foram obtidas por 3 precipitações dos soros com solução saturada de sulfato de amônio, e marcadas com isotiocianato de fluoresceína, segundo técnica utilizada anteriormente por SILVA & KAPLAN¹¹.

Com a finalidade de reduzir as reações inespecíficas, todos os lotes de antiglobulina marcada foram adsorvidos duas vezes com pó de fígado de hamsters, como descrito por COONS & col.².

Todos os conjugados foram testados com fungos homólogos e heterólogos como mostra o Quadro I. A fim de eliminar as reações cruzadas, os conjugados foram adsorvidos com células de fungos escolhidos entre os que apresentaram reações de grupo.

Células de *Sp. schenckii*, *C. immitis*, *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* foram utilizadas nas diferentes adsorções, usando-se volumes iguais de células centrifugadas e conjugado a adsorver. As células de *Sp. schenckii* (Amostra Jordan), *H. capsulatum* (Amostras 28 e 105) e *B. dermatitidis* (Amostra Robinson) foram cultivadas em ágar cérebro-infuso-coração de boi durante 6 dias, após o que foram retiradas do meio e colocadas em solução fisiológica adiciona-

da de formol (0,5%). As células de *C. immitis* (Amostra Silveira) foram cultivadas a 28°C, em caldo-Sabouraud durante 6 dias em agitação constante e a seguir suspensas, também, em salina formolada. Antes de serem usadas nas adsorções, as células foram lavadas duas vezes em solução fisiológica com fosfato tampão (pH 7,2) e centrifugadas. As adsorções foram levadas a efeito em banho-maria a 37°C, durante duas horas e meia.

As reações de imunofluorescência (método direto) foram realizadas usando-se esfregaços de suspensões aquosas das culturas a serem examinadas. Os esfregaços, depois de fixados pelo calor, eram cobertos com o conjugado e colocados em câmara úmida a 37°C, durante 45 minutos. Depois desse período as preparações eram lavadas em salina tamponada com fosfato durante 10 minutos e em seguida, em água destilada durante 5 minutos. Depois de secas ao ar, as preparações eram montadas em líquido contendo 9 partes de glicerina para uma parte de salina tamponada.

As lâminas foram examinadas em microscópio Reichert Biozet equipado com condensador cardioide. Uma lâmpada de vapor de mercúrio Osram HBO-200 montada em uma "Reichert Fluorex Unit" foi usada como fonte de iluminação. O sistema de filtros era constituído de filtro primário "Corning 5113" (3 mm de espessura) e um filtro ocular "Wratten 2A".

Os resultados foram anotados segundo o critério de GOLDMAN³ e MOODY & col.¹⁰: —, ± (ausência de reação), 1+, 2+, 3+ e 4+ (reação positiva).

RESULTADOS

Todos os conjugados reagiram intensamente com células leveduriformes do *Paracoccidioides brasiliensis*.

Como observado em estudo anterior, as células de pequeno diâmetro, principalmente as originadas por criptoesporulação, mostraram sempre reação mais intensa (2+ a 4+) do que as células de maior diâmetro (± a 4+).

A titulação dos conjugados revelou que PB-5 e PB-7 possuíam título de 1:16 a

1:20 e 1:10 a 1:24 respectivamente, para as células maiores, dependendo da amostra testada, e de 1:24 para as células pequenas. Em contraste, PB-4 e PB-6 revelaram títulos bem mais baixos: 1:10 para as células de pequeno diâmetro e 1:2 a 1:8 para as células maiores.

Todos os conjugados reagiram com fungos heterólogos.

Os conjugados PB-5 e PB-7, com mais altos títulos para os organismos homólogos, mostraram reações cruzadas mais intensas e em maior número que os outros dois conjugados.

Como mostra o Quadro I, PB-5 apresentou intensas reações de grupo com *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, *Sp. schenckii* e *H. duboisii* e corou menos intensamente *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parakrusei*, *C. guilliermondii*, *Cryptococcus terreus* e *Rhodotorula sp.*, entre os organismos testados.

PB-7 não apresentou reações de grupo com o *C. terreus*, porém corou com mais intensidade quase todos os organismos que reagiram com o conjugado PB-5 e, em adição, mostrou reações de grupo com outros fungos, como *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *Torulopsis glabrata* e *Geotrichum candidum*.

O lote PB-4 foi o que apresentou menor número de reações cruzadas. Além dos fungos de importância médica como *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, *Sp. schenckii*, *H. duboisii*, *C. albicans* e *G. candidum*, o conjugado somente apresentou reações de grupo com o *C. terreus*.

O conjugado PB-6 mostrou maior número de reações cruzadas que o conjugado PB-4. Embora não reagisse com o *C. terreus*, corou adicionalmente *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis* e *C. krusei*.

A diluição dos conjugados não removeu tôdas as reações de grupo. O *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *Sp. schenckii* ainda reagiram com os conjugados diluídos ao título máximo.

Em conseqüência, técnicas de adsorção foram tentadas, com o objetivo de eliminar as reações com organismos heterólogos. A primeira série de adsorções foi efetuada da mesma maneira que a descrita em trabalho

QUADRO I

Reações de imunofluorescência de diferentes lotes de globulinas anti-*Paracoccidioides brasiliensis* conjugadas à fluoresceína, com fungos homólogos e heterólogos

Espécie	Reações			
	Conjugado PB-4	Conjugado PB-5	Conjugado PB-6	Conjugado PB-7
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (fase cerebriforme)	± a 4+	1+ a 4+	± a 3+	± a 4+
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (fase leveduriforme)	± a 2+	± a 3+	± a 3+	1+ a 4+
<i>Histoplasma capsulatum</i> (fase leveduriforme)	± a 3+	± a 4+	- a 3+	± a 4+
<i>Coccidioides immitis</i> (forma tissular)	1+ a 3+	2+ a 4+	± a 1+	2+ a 4+
<i>Sporotrichum schenckii</i> (fase leveduriforme)	± a 2+	± a 3+	± a 3+	1+ a 4+
<i>Histoplasma duboisii</i> (fase leveduriforme) ..	± a 2+	± a 3+	± a 3+	± a 4+
<i>Candida albicans</i> (serotipo A)	—	± a 1+	—	± a 1+
<i>Candida albicans</i> (serotipo B)	± a 1+	± a 1+	± a 1+	± a 2+
<i>Candida tropicalis</i>	—	± a 2+	—	± a 3+
<i>Candida stellatoidea</i>	—	—	± a 1+	—
<i>Candida pseudotropicalis</i>	—	—	- a 1+	± a 2+
<i>Candida krusei</i>	—	—	± a 1+	± a 3+
<i>Candida parakrusei</i>	±	± a 2+	—	± a 3+
<i>Candida guilliermondii</i>	±	± a 1+	—	± a 3+
<i>Torulopsis glabrata</i>	—	—	- a ±	± a 2+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	—	—	—
<i>Cryptococcus neoformans</i>	—	—	—	- a ±
<i>Cryptococcus diffluens</i>	—	—	—	- a ±
<i>Cryptococcus terreus</i>	± a 2+	1+	- a ±	—
<i>Rhodotorula</i> sp	—	± a 2+	- a ±	± a 4+
<i>Geotrichum candidum</i>	± a 2+	—	- a 1+	- a 3+

anterior¹¹: duas adsorções com *Sp. schenckii*, seguida de uma com *C. immitis*.

Este procedimento também não eliminou as reações cruzadas.

O conjugado PB-4, adsorvido daquela maneira, ainda reagiu com células de *B. dermatitidis* quase tão intensamente como com as células de *P. brasiliensis*. Devido ao baixo título do conjugado depois de adsorvido, não foram feitas tentativas de novas adsorções.

O lote PB-5 depois de adsorvido corou mais intensamente as células do *P. brasiliensis* que o conjugado PB-4, mas as reações de grupo com o *B. dermatitidis* e com uma amostra de *H. capsulatum* (Amostra 105) foram também muito intensas. A tentativa de adsorção desse conjugado, já três vezes adsorvido, com células da amostra 105 de *H. capsulatum*, resultou em completa remoção das reações com o *P. brasiliensis*, bem como com os organismos heterólogos.

O conjugado PB-6, depois de adsorvido com células de *Sp. schenckii* e *C. immitis*, embora não apresentasse reações cruzadas, também não corou o *P. brasiliensis*. Um diferente plano de adsorção do conjugado PB-6 ainda não adsorvido foi tentado, usando-se células de *B. dermatitidis*. Esta tentativa resultou praticamente na eliminação da capacidade do conjugado de reagir com o *P. brasiliensis*.

O lote PB-7, adsorvido da mesma forma que os outros conjugados, comportou-se de modo semelhante a PB-5, com a diferença de que as reações tanto com os organismos homólogos como com os heterólogos, foram bem mais fortes do que com aquele conjugado. Tentativa de adsorção do conjugado PB-7, ainda não adsorvido, com células de *B. dermatitidis* também não resultou na obtenção de um reagente específico para o *P. brasiliensis*. A adsorção por aquele fungo eliminou, para fins práticos, a capacidade do conjugado de corar o *P. brasiliensis*, bem como os organismos heterólogos.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que é possível obterem-se soros com alto título de anticorpos para o *P. brasiliensis*, pela injeção de coelhos previamente vacinados, com células viáveis daquele fungo. Com efeito, os conjugados PB-5 e PB-7 apresentaram títulos mais altos do que os conjugados PB-1 e PB-3 descritos em publicação anterior¹¹ e obtidos a partir de coelhos imunizados com células da mesma amostra do fungo, mortas pelo formol.

A capacidade desses conjugados de corar intensamente o *P. brasiliensis*, no entanto, não parece ser devido a alto título de anticorpos específicos e sim de anticorpos comuns a vários outros fungos. As técnicas de adsorção mostraram que anticorpos específicos, se presentes, pouco contribuíram para a coloração do *P. brasiliensis*. Ao contrário, em estudo anterior¹¹ foi possível obter-se reagentes específicos, embora tais conjugados não reagissem tão intensamente com o *P. brasiliensis*.

A produção de conjugados anti-*P. brasiliensis* por infecção de coelhos normais

(PB-4 e PB-6), como feita neste trabalho, não resultou na obtenção de um produto com título elevado de anticorpos. Anticorpos específicos, se presentes, o foram em nível tão baixo que não puderam ser evidenciados pelas técnicas empregadas.

Os resultados comparativos dos diferentes métodos de imunização de coelhos pelo *P. brasiliensis* usados neste trabalho sugerem que maior intervalo de tempo entre o processo de imunização e a colheita dos soros tem relativa importância na formação de maior número de anticorpos inespecíficos. O conjugado PB-4, por exemplo, reagiu com 8 dos fungos heterólogos testados; o lote PB-6, produzido a partir de material dos mesmos animais, com a diferença de que os soros foram colhidos 20 dias depois, mostrou reações cruzadas com 10 diferentes organismos.

O mesmo foi observado entre os conjugados PB-5 e PB-7 obtidos pela infecção de coelhos anteriormente vacinados. O anti-soro PB-7, colhido 41 dias após a última injeção imunizante, reagiu com 15 outros fungos que não o *P. brasiliensis*; o reagente PB-5, obtido de soros dos mesmos animais, porém colhidos 20 dias antes, somente reagiu com 12 dos fungos heterólogos testados. Ao mesmo tempo, é evidente que os anticorpos mantêm-se em nível elevado pelo menos até os 41 dias depois do processo de imunização.

Os reagentes obtidos pelas técnicas usadas no presente trabalho coram intensamente as células leveduriformes do *P. brasiliensis*, embora não possam ser usadas, de modo geral, para uma inequívoca identificação daquele organismo devido às reações cruzadas que apresentam. No entanto, estes reagentes podem ser de valor prático na diagnose da blastomicose sul-americana. Quando as células do fungo que se apresentam coradas por esses reagentes revelam morfologia típica do *P. brasiliensis*, um diagnóstico pode ser feito. No entanto, nos casos em que a morfologia típica do parasita não pode ser vista, o uso de conjugados específicos é indicado.

Além disso, tais conjugados podem ser de utilidade prática em uma variedade de trabalhos de pesquisa concernentes à paracoccidiodomicose.

SUMMARY

Supplementary studies on the preparation of antiglobulins marked by fluorescein to a cerebriform phase of Paracoccidioides brasiliensis

Four different lots of rabbit *Paracoccidioides brasiliensis* antisera were prepared and their globulin fractions conjugated with fluorescein isothiocyanate. Two lots of these antisera were produced by infecting normal rabbits with viable *P. brasiliensis* yeast-form cells; the other two lots were produced by infecting rabbits that had been immunized previously with formalin-killed yeast form cells of the fungus.

All 4 labeled antibody preparations brightly stained the yeast form of *P. brasiliensis*. In addition, these reagents cross-reacted with elements of the yeast form of *Histoplasma capsulatum*, *H. duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporotrichum schenckii*, the tissue form of *Coccidioides immitis*, and the cells of other heterologous fungi. Attempts to render the conjugates specific for the yeast form of *P. brasiliensis* either by adsorption with heterologous fungi, or by dilution were unsuccessful. By contrast, in a previous study the Authors found that fluorescent antibody reagents specific for the yeast form of this fungus could be prepared from the globulin fraction of sera of rabbits immunized with formalin-killed cells of the fungus. These latter conjugates stained the homologous organism at a good level and cross reactivity could be removed by adsorption with heterologous organisms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENHAM, R. W. — Certain monilias parasitic on man; their identification by morphology and by agglutination. *J. Infect Dis.* 49:183-215, 1931.
2. COONS, A. H. & KAPLAN, M. H. — Localization of antigen in tissue cells. II — Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exper. Med.* 91:1-13, 1950.
3. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein-labeled antibody. II — A new serologic test for antibodies to *Toxoplasma* based upon inhibition of specific staining. *J. Exper. Med.* 105:557-573, 1957.
4. KAPLAN, W. & CLIFFORD, M. D. — Production of fluorescent antibody reagents specific for the tissue form of *Coccidioides immitis*. *Am. Rev. Resp. Dis.* 89:651-658, 1964.
5. KAPLAN, W. & IVENS, M. S. — Fluorescent antibody staining of *Sporotrichum schenckii* in cultures and clinical materials. *J. Invest. Dermat.* 35:151-159, 1960.
6. KAPLAN, W. & KAUFMAN, L. — Specific fluorescent antiglobulins for the detection and identification of *Blastomyces dermatitidis* yeast-phase cells. *Mycopath. et mycol. appl.* 19:173-180, 1963.
7. KAUFMAN, L. & KAPLAN, W. — Preparation of a fluorescent antibody specific for the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bact.* 82:729-735, 1961.
8. KAUFMAN, L. & SHARON, B. — Development and evaluation of agglutination and fluorescent antibody procedures for the identification of *Cryptococcus neoformans*. In press.
9. KELLEY, W. H. — A study of the cell and colony variations of *Blastomyces dermatitidis*. *J. Infect. Dis.* 64:293-296, 1939.
10. MOODY, M. D.; GOLDMAN, M. & THOMASON, B. M. — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. I — General methods for *Malleomyces pseudomallei*. *J. Bact.* 72:357-361, 1956.
11. SILVA, M. E. & KAPLAN, W. — Specific fluorescein-labeled anti-globulins for the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 14:290-294, 1965.

Recebido para publicação em 22/7/1965.