

OBTENÇÃO DE EXOANTÍGENOS DE *Histoplasma capsulatum* EM MEIO DE NEOPEPTONA, GLICOSE, TIAMINA E ASPARAGINA (NGTA)

Nilma Maciel GARCIA (1), Cezar Mendes de ASSIS (2), Gilda Maria Barbaro DEL NEGRO (1)
& Carlos da Silva LACAZ (1)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a produção de exoantígenos H e M das amostras 58, B-679, A-811 e O187 de *Histoplasma capsulatum*, utilizando o meio NGTA (neopeptona, glicose, tiamina e asparagina) em períodos de cultivo de 1, 2 e 3 meses, a 36°C, sob agitação constante (50 v.p.m.). Os antígenos brutos foram avaliados contra anti-soro e antígeno de *Histoplasma capsulatum* de referência (Center for Disease Control), 4 soros de pacientes portadores de paracoccidioidomicose, 7 de histoplasmose e soro hiperimune anti-H. *capsulatum* produzido em coelhos, através da reação de imunodifusão dupla. Verificou-se que, com exceção de B-679 com 1 mês de crescimento, todos os demais exoantígenos apresentaram as frações H e M de precipitação. Os exoantígenos obtidos de A-811 apresentaram só a banda H. Excetuando-se os exoantígenos 58 e B-679 com 1 mês de crescimento, todos os demais exoantígenos reagiram contra soros de pacientes com histoplasmose. Em relação aos soros de pacientes com paracoccidioidomicose, somente os exoantígenos 58 e O187 não apresentaram reação cruzada. Todos os exoantígenos reagiram frente ao soro hiperimune de coelho anti-H. *capsulatum*. Para obtenção de exoantígenos de H. *capsulatum*, sugerimos que as amostras sejam cultivadas sob as condições anteriormente descritas, adotando-se o período de 3 meses de crescimento, utilizando-se exoantígenos de referência como controles da reação.

UNITERMOS: *Histoplasma capsulatum*; Imunodifusão dupla; Exoantígenos H e M; Meio de NGTA.

INTRODUÇÃO

A histoplasmose é infecção micótica provocada pelo *Histoplasma capsulatum*, fungo dimórfico, que pode ser cultivado sob as formas M (miceliana) e Y (leveduriforme), esta última obtida a 36°C e em condições especiais de cultivo^{12, 13, 14, 21}.

A doença apresenta distribuição universal, prevalecendo em regiões de clima tropical e

temperado, com maior número de casos descritos na região do leste dos Estados Unidos e em quase toda a América Latina. H. *capsulatum* tem sido isolado de solos secos, contaminados com fezes de morcegos, galinhas e outras aves, sendo as grutas e galinheiros os reservatórios mais importantes.

Essencialmente, a histoplasmose ocorre sob quatro formas clínicas básicas: benigna ou assin-

(1) Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 455 — 2º andar. CEP 01246 São Paulo. SP. Brasil.

(2) Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. SP. Brasil.

tomática, pulmonar aguda, disseminada e pulmonar crônica¹.

Atualmente existe uma variedade de provas sorológicas de valor diagnóstico, auxiliando também o acompanhamento da terapêutica e controle de cura dos pacientes. Provas de fixação de complemento¹⁹, contraimunoeletroforese⁹ e imunodifusão dupla^{5, 11} são as mais utilizadas e de maior valor. Na prova de imunodifusão dupla várias bandas de precipitação podem ser observadas, sendo duas delas, H e M, de maior interesse^{6, 7, 18}. Pacientes demonstrando a banda H de precipitação estão geralmente em estágio agudo e progressivo de doença ativa; a demonstração somente da banda M indica estágio crônico da infecção ou contato anterior com o agente etiológico; o aparecimento da banda M pode ser influenciado pelo teste cutâneo à histoplasmina. Neste caso, esta reação não pode ser levada em consideração quando se deseja distinguir a fase ativa ou inativa da doença⁴.

A presença de ambas bandas H e M em provas de precipitação em gel de ágar ou agarose, é altamente indicativo de histoplasrose ativa, até mesmo quando outras provas apresentam-se negativas.

Em testes de imunodifusão dupla, geralmente a banda H aparece próxima ao orifício do soro e a banda M, próxima ao orifício do antígeno. Entretanto, dependendo da concentração relativa de antígeno e anticorpo, podem as mesmas terem invertidas suas posições normais²⁰.

A avaliação sorológica de pacientes através da técnica de imunodifusão dupla depende, sobretudo, do uso de uma histoplasmina padrão que contenha ambos os antígenos, H e M^{15, 17}.

O presente trabalho relata a utilização do meio de cultura NGTA, baseado no meio de Negroni (1968)^{3, 10, 16}, para a produção das frações antigênicas H e M, utilizando quatro amostras de *Histoplasma capsulatum*, cultivadas a 36°C, com agitação constante e em diferentes períodos de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungos: Para o estudo da produção de antígenos H e M, foram utilizadas quatro amostras

de *H. capsulatum*: O187, isolada de um paciente com histoplasrose; 58, mantida na Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; B-679 e A-811, obtidas do Center for Disease Control (CDC-Atlanta-USA).

Preparo do meio de cultura: Trinta gramas de neopeptona foram dissolvidas em 120 ml de água destilada, previamente aquecida a 45°C. A solução foi dialisada contra 2000 ml de água destilada durante 5 horas a 70°C e, por uma noite, em geladeira. O conteúdo da membrana de diálise foi retirado e o volume completado para 1800 ml com água destilada. Dezoito gramas de glicose anidra, 0,18 g de tiamina e 0,36 g de asparagina foram adicionados (esta última foi dissolvida à quente, separadamente, antes de ser adicionada ao meio). O meio de cultura foi homogenizado e o pH acertado para 6,8-7,0. A seguir, foi distribuído em porções de 250 ml em frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 ml e autoclavado a 120°C por 15 minutos.

Obtenção dos antígenos filtrados de cultura: Cada amostra do fungo, inicialmente na fase miceliana, foi cultivada, em meio NGTA sólido e deixada a 36°C. Repiques a cada 15 dias foram realizados, durante período de 2 meses. Em seguida, fragmentos de ágar de 0,25 cm² de cada amostra foi transferido para frascos Erlenmeyer contendo 100 ml de NGTA líquido, mantidos sob agitação constante (estufa com agitação ÉTICA S. A., São Paulo — Brasil) a 50 voltas por minuto, 36°C, durante 1 mês. Após este período, 5 ml de cada cultura foram semeados em frascos Erlenmeyer contendo 250 ml do mesmo meio de cultura. Os frascos foram incubados a 36°C durante períodos de 1,2 e 3 meses. Os cultivos foram feitos em triplicata para cada período de crescimento.

Passados os períodos de crescimento, as culturas foram mertiolatadas (concentração final 1:5000), mantidas durante uma semana em geladeira e, após realização de teste de viabilidade, foram filtradas em papel de filtro "Whatman n° 1"; em seguida, os filtrados brutos foram dialisados contra água destilada por 24 horas em geladeira, concentrados 15 vezes por evaporação, estocados em frascos estéreis e mantidos em geladeira até momento do uso.

Obtenção de anti-soro: Dois coelhos machos, de 3 kg de peso foram inoculados via subcu-

tânea, com 0,5 ml de antígeno de *H. capsulatum* emulsionado com 0,5 ml de adjuvante completo de Freund (Difco, USA); foram realizadas 10 inoculações com intervalos de 3 dias. Doze dias após a última inoculação, foi feita sangria total dos animais.

O antígeno utilizado para as inoculações foi preparado como se segue: um "pool" de filtrados de cultura obtidos das 4 amostras de *H. capsulatum* cultivadas em NGTA durante 3 meses (conforme técnica anteriormente descrita) o qual apresentou bandas de precipitação contra soros de pacientes portadores de histoplasmose em prova de imunodifusão dupla, foi precipitado com 70% de etanol absoluto, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Volume de etanol adicionado} = \frac{\text{Volume do antígeno} \times 70}{100 - 70}$$

O "pool" de antígenos foi colocado em balão de vidro, em banho de gelo, com agitação constante, acrescentando-se o etanol gota a gota. A mistura permaneceu sob agitação por mais 15 minutos após a adição do etanol, e em seguida, centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos. Ao precipitado formado, adicionou-se solução fisiológica até completar-se metade do volume inicial de antígeno e, em seguida, dialisado contra água destilada por uma noite em geladeira.

Soros e antígenos de referência: Foram utilizados anti-soro e antígeno H e M de *Histoplasma capsulatum*, fornecidos pelo Centers for Disease Control (CDC — Atlanta, USA, lote 78-0326), 7 soros de pacientes portadores de histoplasmose e 4 de paracoccidioidomicose.

Imunodifusão dupla: Lâminas de vidro com dimensões de 26 x 75 mm foram recobertas com 3 ml de ágar citrato a 1% (1% de ágar purificado Difco; 0,9% de cloreto de sódio; 0,4% de citrato de sódio; 7,5% de glicina e 0,01% de mertiolate). Após solidificação do ágar, foram realizados testes de imunodifusão dupla, onde os antígenos de todas as amostras do fungo foram testados frente aos soros acima citados. As lâminas foram lavadas em solução fisiológica por 48 horas, secas em estufa, coradas pelo corante "Coomassie brilliant blue R-250" (Sigma) e descoradas com o solvente composto de 45% de etanol

absoluto, 10% de ácido acético glacial e 45% de água destilada. Todos os antígenos foram analisados quanto à formação das bandas H e M de precipitação.

RESULTADOS

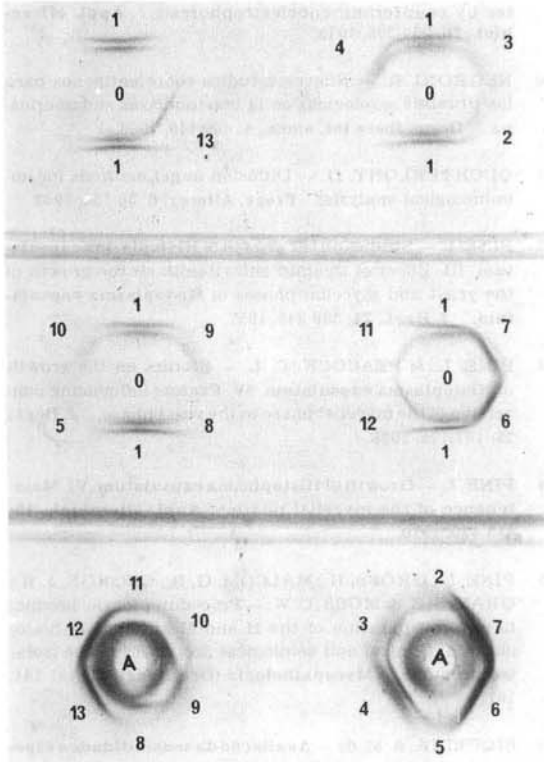
Conforme mostra a figura 1, verifica-se que os filtrados de cultura obtidos das amostras 58, O187 e B-679 de *H. capsulatum* apresentaram as frações antigênicas H e M pelo teste de imunodifusão dupla, com exceção do filtrado de cultura da amostra B-679 com 1 mês de crescimento. Os exoantígenos obtidos da amostra A-811 apresentaram somente a banda H. Com exceção dos exoantígenos obtidos das amostras 58 e B-679 com 1 mês de cultivo, todos os demais reagiram contra soros de pacientes portadores de histoplasmose. Em relação aos pacientes portadores de paracoccidioidomicose, os exoantígenos das amostras 58 e O187 não apresentaram reação cruzada. Todos os exoantígenos reagiram contra soro hiperimune de coelho anti-*H. capsulatum*.

DISCUSSÃO

Testes sorológicos têm sido utilizados rotineiramente no diagnóstico da histoplasmose⁸, dentre eles, as reações de fixação de complemento, imunodifusão dupla e contraímunoeletroforese; através destas duas últimas, é possível determinar a presença das bandas H e M de precipitação, características do *Histoplasma capsulatum*^{9, 15, 20}.

A determinação das duas bandas de precipitação auxilia o diagnóstico da doença, bem como o acompanhamento do tratamento e controle de cura dos pacientes, uma vez que a detecção da banda M sugere infecção na fase de resolução, enquanto a banda H, doença em atividade⁴.

A avaliação dos soros de pacientes através da técnica de imunodifusão dupla depende, sobretudo, do uso de um antígeno de referência que contenha ambas as frações antigênicas H e M. Com o intuito de obtermos um antígeno no qual estas frações estivessem presentes, propusemos a utilização de um meio de cultura e de uma metodologia para a obtenção do reagente em tempo relativamente menor do que



Legenda — 1: antígeno H e M de referência (CDC, Atlanta — USA); 0: anti-soro H e M de referência (CDC, Atlanta — USA); A: anti-soro de coelho anti-*H. capsulatum*; 2: amostras O187 com 1 mês de cultivo; 3: amostra O187 com 2 meses de cultivo; 4: amostra O187 com 3 meses de cultivo; 5: amostra B-679 com 1 mês de cultivo; 6: amostra B-679 com 2 meses de cultivo; 7: amostra B-679 com 3 meses de cultivo; 8: amostra 58 com 1 mês de cultivo; 9: amostra 58 com 2 meses de cultivo; 10: amostra 58 com 3 meses de cultivo; 11: amostras A-811 com 1 mês de cultivo; 12: amostras A-811 com 2 meses de cultivo; 13: amostra-A-811 com 3 meses de cultivo.

Fig. 1 — Fotografia referente à imunodifusão dupla das amostras de *H. capsulatum* nos diferentes períodos de crescimento, frente ao anti-soro de coelho e anti-soro H e M de referência.

os comumente utilizados em técnicas já descritas¹⁷.

Para tal utilizamos o meio NGTA, pois, de acordo com o que foi demonstrado na produção de antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*,

segundo DEL NEGRO et al², tentamos verificar se o mesmo meio de cultura poderia ser adequado para a obtenção de exoantígenos do *H. capsulatum*. Desta forma, cultivamos o fungo a 36°C em NGTA, sob agitação constante, durante períodos de 1, 2 e 3 meses, e verificamos que as amostras O187 e 58 produziram as frações H e M a partir do 1º mês de cultivo, porém formando bandas de precipitação de baixa intensidade através do teste de imunodifusão dupla, não apresentando reação cruzada com os soros de pacientes portadores de paracoccidioidomicose. A amostra A-811 foi produtora somente de exoantígeno H, enquanto a amostra B-679 produziu ambas as frações somente a partir do 2º mês de cultivo.

Diante dos resultados obtidos, sugerimos que o fungo seja cultivado conforme as condições acima descritas, adotando-se porém, o período de cultivo de 3 meses, pois os antígenos obtidos neste período, mostraram bandas de precipitação de maior intensidade pelo teste de imunodifusão dupla.

Outros estudos imunoquímicos serão realizados no sentido de se analisar a composição destes filtrados de cultura, na tentativa de definir outras prováveis frações antigênicas presentes, que não H e M, observadas em imunodifusão dupla, frente ao soro hiperimune produzido em coelhos.

SUMMARY

Histoplasma capsulatum exocellular antigens. Obtenção in neopeptone, glucose, thiamine and asparagine medium (NGTA)

The purpose of this work is obtaining exocellular antigens H and M from 4 *H. capsulatum* strains using NGTA medium (neopeptone, glucose, thiamine and asparagine) for periods of 1, 2 and 3 months, at 36°C and continuously shaken. The exocellular antigens were evaluated by double immunodiffusion test against *H. capsulatum* rabbit antiserum, 7 histoplasmosis sera, 4 paracoccidioidomycosis sera and a reference antigen and antibody furnished by C.D.C. (Atlanta — USA).

Except for the exocellular antigen from strain B.679 with 1 month of culture, all exocellular antigens obtained from the strains B.679, 58 and O187 showed the H and M bands. The A.811 strain demonstrated only the fraction H.

All the exocellular antigens reacted positively with sera from histoplasmosis patients, except those obtained from strains 58 and B.679 with 1 month of culture. With regard to paracoccidioidomycosis patients sera, the exocellular antigens from strains 58 and O187 did not cross-react with them.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJELLO, L. — Histoplasmosis — A dual entity: Histoplasmosis capsulati and Histoplasmosis duboisii. *L'Igiene mod.*, 79: 3-30, 1983.
2. DEL NEGRO, G. M. B.; GIANNINI, M. J. M.; GARCIA, N. M. & ASSIS, C. M. — Occurrence of 43 Kda glycoprotein (GP43) in different culture filtrates of *P. brasiliensis* (strain FMUSP 113). In: *Jornada Científica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 3., São Paulo, 1989. *Anais* p. 101. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 31 (Supl. 7): 101, 1989.
3. EVANS, E. E. & KESSEL, J. P. — The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. II. Serologic studies with the capsular polysaccharide. *J. Immunol.*, 67: 109-114, 1952.
4. HEIMER, D. C. — Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reaction in agar gel. *Pediatrics*, 22: 616-627, 1958.
5. KAUFMAN, L. — Micro agar-gel immunodiffusion tests. In: *Manual of Standardized Serodiagnostic Procedures for Systemic Mycoses*. Part 1: Agar Immunodiffusion tests. Washington, Pan American Health Organization, Department of Research Development and Coordination, 1972. p. 9-14.
6. KAUFMAN, L. & STANDARD, P. — Improved version of the exoantigen tests for identification of *Coccidioides immitis* and *Histoplasma capsulatum* cultures. *J. clin. Microbiol.*, 8: 42-45, 1978.
7. KAUFMAN, L. & STANDARD, P. — Immuno-identification of cultures of fungi pathogenic to man. *Curr. Microbiol.*, 1: 135-140, 1978.
8. KAUFMAN, L. — Mycoserology: Its Vital Role in Diagnosis Systemic Mycotic Infections. *Jap. J. med. Mycol.*, 24: 1-8, 1983.
9. KLEGER, B. & KAUFMAN, L. — Detection and Identification of Diagnostic *Histoplasma capsulatum* precipitates by counterimmunoelectrophoresis. *Appl. Microbiol.*, 26: 231-238, 1973.
10. NEGRONI, R. — Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas serológicas en la blastomicosis sudamericana. *Derm. ibero lat. amer.*, 4: 409-416, 1968.
11. OUCHTERLONY, O. — Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 6: 30-154, 1962.
12. PINE, L. — Studies on the growth of *Histoplasma capsulatum*. III. Effect of thiamin and vitamin on the growth of the yeast and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bact.*, 74: 239-245, 1957.
13. PINE, L. & PEACOCK, C. L. — Studies on the growth of *Histoplasma capsulatum*. IV. Factors influencing conversion of the mycelial phase to the yeast phase. *J. Bact.*, 75: 167-174, 1958.
14. PINE, L. — Growth of *Histoplasma capsulatum*. VI. Maintenance of the mycelial phase. *Appl. Microbiol.*, 19: 413-420, 1970.
15. PINE, L.; GROSS, H.; MALCOM, G. B.; GEORGE, J. R.; GRAY, S. B. & MOSS, C. W. — Procedures for the production and separation of the H and M antigens in histoplasmin: Clinical and serological properties of the isolated products. *Mycopathologia (Den Haag)*, 61: 131-141, 1977.
16. SIQUEIRA, A. M. de — Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e o controle de cura da paracoccidioidomycose. Caracterização imunoquímica do antígeno E₂ do *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, 1982. (Tese de Doutorado — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
17. SMITH, C. D. & GOODMAN, N. L. — Improved culture method for the isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* from contaminated specimens. *Amer. J. clin. Path.*, 63: 276-280, 1975.
18. STANDARD, P. G. & KAUFMAN, L. — Specific Immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J. clin. Microbiol.*, 3: 191-199, 1976.
19. U. S. Public Health Service. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to micro test. Washington, D.C., U.S. Govt. Printing Office, 1965. (PH monograph n° 74, U.S. Public Health Serv. Publ. 1228)
20. WIGGINS, G. L. & SCHUBERT, J. H. — Relationship of histoplasmin agar-gel bands and complement fixation titers in histoplasmosis. *J. Bact.*, 89: 589-596, 1965.
21. YOSHINO, M. K.; TEIXEIRA, C. C.; SOARES, M. C. P.; FERREIRA, N. A. F. & RODRIGUES, M. S. — Histoplasmosose. *Arq. bras. Med.*, 61: 89-92, 1987.

Recebido para publicação em 07/03/1990