

REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO CONGLUTINANTE NA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA

Lucia M. SINGER⁽¹⁾ e Celeste FAVA NETTO⁽²⁾

RESUMO

Estudou-se a reação de fixação do complemento conglutinante na blastomicose sul-americana usando-se antígeno polissacarídico extraído de células leveduriformes do *Paracoccidioides brasiliensis*. Foram determinadas, inicialmente, a dose ótima de antígeno, e as condições ótimas de incubação primária, quanto ao tempo e à temperatura. Em seguida, foram estudados 36 soros de 18 pacientes de blastomicose sul-americana e sete de indivíduos normais, pela reação de fixação do complemento conglutinante, comparativamente com as reações de precipitação e de fixação do complemento hemolítica.

Os Autores concluíram que, do ponto de vista diagnóstico a reação de fixação do complemento conglutinante não apresenta vantagens sobre as reações já estudadas de precipitação e de fixação do complemento hemolítica. Os resultados obtidos indicam, no entanto, a necessidade de novos estudos para esclarecer a natureza do anticorpo responsável pela reação de fixação do complemento conglutinante.

INTRODUÇÃO

Numerosos são os trabalhos publicados a partir de 1910 sobre a utilização da reação de fixação do complemento conglutinante (RFCC) no diagnóstico de infecções por bactérias, vírus, riquetsias e protozoários no homem e nos animais. Relação dos trabalhos já publicados é encontrada nas revisões de COOMBS & col.² e LACHMANN³. CAWDERY & col.¹ compararam a RFCC com a reação de fixação do complemento hemolítica (RFCH) no diagnóstico da febre da costa leste (East Coast Fever): enquanto era impossível fazer diagnóstico pela RFCH os Autores obtiveram bons resultados com a RFCC. Em 1968, GULRAJANI & col.⁷ realizaram pesquisa sobre a RFCC no diagnóstico da brucelose bovina obtendo resultados superiores àqueles das reações de aglutinação em tubos e em placas. De modo geral os trabalhos referidos na literatura são discordantes quanto ao valor da RFCC no diagnóstico das várias

infecções principalmente quando consideradas a sensibilidade e a especificidade de tal reação.

Não encontrando, na literatura consultada, referências sobre o emprego da RFCC no diagnóstico das micoses profundas, procuramos estudá-la na blastomicose sul-americana. Para a avaliação correta de tal tipo de reação empregamos como parâmetros já bem conhecidos na blastomicose sul-americana as reações de precipitação e de fixação do complemento hemolítica, comparativamente realizadas nos mesmos soros.

MATERIAL E MÉTODOS

1) *Antígeno* — Foi utilizado antígeno polissacarídico, extraído de células leveduriformes do *P. brasiliensis*, conforme técnica descrita por FAVA NETTO³ e FAVA NETTO & col.⁶.

(1) Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Processo: Médicas 70/325.
(2) Professor adjunto de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

RESULTADOS

2) *Soros* — Foram examinados 36 soros de 18 pacientes de blastomicose sul-americana e sete de igual número de indivíduos normais, todos colhidos no Hospital das Clínicas e na Faculdade de Medicina da U.S.P.

3) *Complemento de cavalo* — Foi utilizada mistura de soros de dois cavalos como fonte de complemento para a reação de congulinção. Os soros foram gentilmente cedidos pelo Instituto Pinheiros e conservados a -20°C em pequenas alíquotas depois de misturados.

4) *Conglutinina e anticorpo heterófilo* — Estes elementos são encontrados naturalmente em sôro de boi. O sôro nos foi fornecido gentilmente pelo Instituto Pinheiros e conservado a -20°C em pequenas alíquotas.

5) *Hemácias de carneiro* — Utilizamos sempre mistura de hemácias de dois carneiros sendo que o sangue de cada animal era colhido e preservado em solução de Alsever.

6) *Solução fisiológica* — Foi usada solução fisiológica tamponada com veronal de acôrdo com a fórmula fornecida por FAVA NETTO³.

7) *Complemento de cobaio e hemolisina* — Preparados e usados segundo as recomendações de FAVA NETTO³.

8) *Sôro positivo testemunho* — Constituído de mistura de soros de casos comprovados de blastomicose sul-americana. Guardado em pequenas alíquotas a -20°C . Essa mistura foi usada, como testemunho positivo, tôda a vez que eram realizadas as reações e também no estudo do antígeno e das condições ótimas para a reação.

9) *Técnica da RFCC* — Foi empregado o método de HOLE & COOMBS⁸ como descrito por COOMBS & col.² tanto na titulação dos elementos como na realização das reações.

10) *Técnica da RFCH* — Esta reação foi realizada segundo a técnica preconizada por FAVA NETTO³.

11) *Reação de precipitação* — Executada da segundo FAVA NETTO⁵.

1) *Determinação da dose ótima de antígeno*

A Tabela I refere os resultados obtidos na titulação do antígeno que foi empregado em tôdas as experiências aqui referidas. Como se observa na Tabela I o antígeno polissacarídico obtido do *Paracoccidioides brasiliensis* é ligeiramente anticomplementar até a diluição de 1/5 e a maior diluição que ainda revelava o maior título para o sôro positivo (dose ótima) era de 1/40. Esta diluição do antígeno foi utilizada em tôdas as RFCC.

2) *Determinação da temperatura e período de tempo ideais de incubação para a reação de fixação do complemento congulinante*

A Tabela II refere os resultados obtidos neste estudo. A primeira coluna registra as temperaturas e a segunda os tempos de incubação. Na terceira coluna são referidos os títulos obtidos para o sôro positivo e na quarta a atividade anticomplementar do mesmo sôro. Nas quinta, sexta e sétima colunas estão referidos os resultados obtidos nos testemunhos usados sendo que os números representam a intensidade da congulinção.

Verifica-se pelos resultados da Tabela II que o aumento da temperatura e também o do tempo de incubação aumentam o poder anticomplementar do antígeno. Verifica-se, ainda pelos resultados da Tabela II, que o complemento de cavalo perde a atividade quando incubado por 4 horas à temperatura ambiente ou 30 minutos a 37°C . A incubação a 4°C não altera a sua atividade mesmo após 18 horas de incubação. Também a atividade anticomplementar do sôro positivo aumenta com o aumento da temperatura e do tempo de incubação. Baseados em tais titulações, elegemos como condições ideais de tempo e temperatura para a incubação primária da RFCC, 2 horas a 4°C , pois com esta incubação obteve-se um título alto para o sôro positivo e o testemunho do sôro mostrou-se também dos mais satisfatórios.

3) *Resultados obtidos na blastomicose sul-americana*

A Tabela III refere os resultados obtidos no estudo de 36 soros de 18 pacientes de

TABELA I
Titulação do antígeno de *P. brasiliensis* com uma mistura de soros positivos para blastomicose sul-americana

Diluições do soro → Diluições do antígeno ↓	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	Testem. do antígeno (s/soro)
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1/8	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	4	4	4
1/10	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	4	4
1/16	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	4	4
1/20	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4	4
1/32	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4	4
1/40	0	0	0	0	0	0	1	2	4	4	4	4	4
1/64	0	0	0	0	1	1	3	3	4	4	4	4	4
1/80	0	0	0	0	1	1	3	4	4	4	4	4	4
1/128	0	0	0	0	1	1	3	4	4	4	4	4	4
1/160	0	0	0	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
Testem. do soro (sem antígeno)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	Test. do C 4

A leitura foi feita segundo Coombs & col.² na qual os valores de 1 a 4 indicam o grau de congulinção. 0 indica falta de congulinção. O título do soro é dado pelo 1.º tubo que apresenta congulinção 3 ou 4

TABELA I I

Estudo de tempo e temperatura ideais para a incubação primária da R.F.C.C. no sistema *P. brasiliensis* — sôro anti-*P. brasiliensis*

Temperatura	Tempo	Título de anticorpo fixador do complemento congulinante anti- <i>P. brasiliensis</i>	Poder anticomplementar do sôro (testem. do sôro)	Leitura do testemunho do antígeno	Leitura do testemunho do complemento	Leitura do testemunho do sistema indicador
4°C	30'	1/64	1/4	4	4	0
	1 h	1/64	1/2	4	4	0
	2 hs	1/256	1/2	4	4	0
	4 hs	1/64	1/4	4	4	0
	18 hs	> 1/4096	1/128	0	4	0
T°C Ambiente	15'	1/512	1/8	4	4	0
	30'	> 1/4096	1/8	2	4	0
	1 h	> 1/4096	1/8	0	4	0
	2 hs	> 1/4096	1/16	0	4	0
	4 hs	> 1/4096	1/128	0	2	0
37°C	5'	> 1/4096	1/8	1	4	0
	15'	> 1/4096	1/8	0	4	0
	30'	> 1/4096	1/16	0	2	0
	1 h	> 1/4096	1/64	0	2	0
	2 hs	> 1/4096	> 1/4096	0	1	0

blastomicose sul-americana pelas RFCH, reação de precipitação e RFCC, sendo que a penúltima coluna refere o poder anticomplementar de cada sôro na RFCH (referido pela porcentagem de hemólise obtida com 1 e 2 unidades 50% de hemólise de complemento) e a última o poder anticomplementar de alguns soros na RFCC (dado pela diluição do sôro). De alguns pacientes foram examinados vários soros para acompanhamento evolutivo. Todo dia em que se realizaram as reações, eram incluídos testemunhos de sôro positivo, do complemento, do sistema indicador e do antígeno que não se encontram re-

feridos na Tabela III. Tais testemunhos garantiam a fidelidade dos resultados obtidos.

Também não estão referidos na Tabela III os resultados obtidos em sete soros normais porque foram todos negativos com exceção de uma RFCC que revelou resultado positivo com sôro não diluído.

Como se verifica pelos resultados referidos na Tabela III, aqueles obtidos pela RFCH e de precipitação estão dentro do que já é conhecido através dos trabalhos de FAVA NETTO^{3, 5}. No entanto, a RFCC revelou resultados positivos em dois pacientes em que a RFCH era negativa. De modo geral parece haver

TABELA III

Estudo comparativo das reações de fixação do complemento hemolítica, congulinante e pesquisa de precipitinas em pacientes de blastomicose sul-americana comprovada

Paciente	Data	Título de anticorpos pela R.F.C.H. (1)	Reação de precipitação	Título de anticorpos pela R.F.C.C.	Testemunho do soro pela R.F.C.H. (2)	Testemunho do soro pela R.F.C.C.
LG	30-09-69	58,0	++++	1/1024	10-50	—
	04-12-69	85,0	—	1/64	10-60	—
	07-01-70	48,0	—	1/32	10-20	1/4
	19-02-70	120,0	—	1/64	30-100	—
	01-04-70	116,0	—	1/64	40-90	—
	14-05-70	110,0	—	1/512	10-65	—
PC	15-01-68	14,0	—	1/32	10-35	—
	27-08-68	9,0	—	1/16	10-70	—
	28-11-68	10,0	—	1/16	10-70	—
	18-03-70	10,0	—	1/8	40-100	—
A.P. P.	10-04-70	16,0	—	1/64	10-20	1/8
	13-04-70	16,0	—	1/64	10-20	1/2
HPS	09-04-70	240,0	—	1/128	10-60	—
	30-04-70	180,0	—	1/128	10-65	—
LS	29-10-68	5,5	++++	1/256	10-50	1/4
	31-10-68	8,5	++++	1/256	10-40	1/1
	09-04-70	4,2	—	1/32	10-40	—
MAC	06-02-70	49,0	—	1/512	50-100	—
	19-02-70	79,0	+	1/2048	20-100	—
	09-03-70	61,0	—	1/256	30-80	—
ALF	23-01-70	—	++++	1/128	10-25	1/8
	04-02-70	—	—	1/128	10-20	1/32
	19-02-70	—	+++	1/32	10-35	1/8
JB	03-02-70	28,0	++++	1/128	10-65	1/2
	27-04-70	20,0	++	1/32	10-35	1/2
A.P. P.	12-02-70	77,0	—	1/2048	60-100	1/32
	11-05-70	67,0	+++	1/2048	10-65	1/16
VB	08-04-70	20,0	++	1/128	50-100	—
APP	08-04-70	28,0	—	1/128	55-100	—
BRL	10-04-70	28,0	—	1/64	10-65	—
JVC	03-12-69	6,0	—	1/8	15-65	—
JGO	02-12-69	15,0	—	1/64	10-20	1/2
G	09-03-70	75,0	+++	1/256	65-100	—
LM	09-03-70	—	+++	1/32	50-90	—
MDOC	15-04-70	8,0	—	1/8	20-75	—
MBC	16-04-70	25,0	—	1/32	40-100	—

(1) O título representa unidades (50% de hemólise de complemento fixado por 0,05 ml de soro)
 (2) Dado em percentagens de hemólise com 1 e 2 unidades 50% de hemólise de complemento

melhor concordância entre os resultados obtidos pelas reações de precipitação e RFCC no sentido de que, quando a reação de precipitação é positiva, os títulos pela RFCC são bem elevados.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelam boa sensibilidade para a reação de fixação do complemento congulinante sendo que resultados positivos são obtidos mesmo quando a reação de fixação do complemento hemolítica é negativa. A introdução de mais esta RFCC para diagnóstico poderia, talvez, aumentar a sensibilidade da sorologia com esta finalidade. Mas segundo FAVA NETTO⁵ a associação das reações de precipitação e RFCH já revelam resultados positivos em 98,4% dos pacientes de blastomicose sul-americana e dada a complexidade da RFCC não devisamos maiores vantagens na sua utilização com finalidades diagnósticas. A análise dos resultados que obtivemos demonstra, por outro lado, não haver correspondência entre os títulos obtidos pelas RFCH e RFCC.

Por outro lado, verificamos que quando a reação de precipitação é positiva os títulos obtidos com a RFCC são geralmente altos, mostrando certo paralelismo de comportamento dos anticorpos envolvidos. FAVA NETTO & col.⁴ demonstraram a correspondência entre reação de precipitação positiva e a positividade das provas que indicam a chamada "fase aguda do sôro". A reação de precipitação positiva indica, portanto, atividade da doença. Estes fatos são concordantes na indicação de que vários tipos de anticorpos aparecem na blastomicose sul-americana. Alguns doentes segundo nossa experiência elaboram de preferência anticorpo precipitante e que é possivelmente responsável pela RFCC. Pretendemos isolar e caracterizar os tipos de anticorpos que aparecem na blastomicose sul-americana, bem como estabelecer as relações que cada um mantém com as reações de precipitação, RFCH e RFCC.

Na presente pesquisa em sete soros de indivíduos normais obtivemos um resultado positivo pela RFCC com sôro não diluído. A explicação para êste resultado poderia ser encontrada na menor especificidade da RFCC ou na sua maior sensibilidade já que em

nosso meio a "blastomicose infecção" ocorre em cerca de 25% da população FAVA NETTO & RAPHAEL (1961).

SUMMARY

Conglutinating complement fixation reaction in the South American blastomycosis

The conglutinating complement fixation test was used in the study of the South American blastomycosis with a polysaccharidic antigen obtained from the *Paracoccidioides brasiliensis*. This study refers the standardization of the conglutinating complement fixation test by setting the conditions of temperature and period of time for the primary incubation and by determining the "optimum" doses of antigen to be used.

The results obtained in 36 sera from 18 patients and 7 sera from normal individuals are referred in parallel to the results obtained in the same sera by the precipitin test and the hemolytic complement fixation test.

The Authors got the conclusion that conglutinating complement fixation test besides increasing the sensitivity in the serological diagnosis if employed as a new test together with the precipitin and hemolytic complement fixation tests, by its complexity is not worth in this aspect. On the other hand the results indicates that more than one type of antibodies are involved on the possible explanation for the different behaviour of the three types of reactions used.

It is the purpose of the Authors to study this aspect of the problem.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à técnica Ida Mello Sciannaméa pelo auxílio na execução das reações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAWDERY, M. J. H.; SIMMONS, D. J. C.; McAMULTY, E. G. & ROSS, H. M. — *Theileria parva*: possible serological test for East Coast Fever. *Exp. Parasit.* 23:234-237, 1968.
2. COOMBS, R. R. A.; COOMBS, A. M. & INGRAM, D. G. — *The Serology of Conglutination and its Relation to Disease*. Oxford, Blackwell, 1961.

3. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exper.* 18:197-254, 1955.
4. FAVA NETTO, C.; FERRI, R. G. & LACAZ, C. S. — Proteinograma e algumas "provas da fase aguda do soro" na blastomicose sul-americana. Estudo comparativo com as reações de fixação do complemento e de precipitação. *Med. Cir. Farm.* 277:157-163, 1959.
5. FAVA NETTO, C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. Adolfo Lutz (São Paulo)* 21:99-194, 1961.
6. FAVA NETTO, C.; VEGAS, V. S.; SCIANNAMÉA, I. M. & GUARNIERI, D. B. — Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:177-181, 1969.
7. GULRAJANI, T. S.; MISRA, R. P. & VERMA, J. C. — Application of conglutinating complement adsorption test for detecting antibodies from the natural cases of bovine brucellosis. *Indian Vet. J.* 45:18-21, 1968.
8. HOLE, N. H. & COOMBS, R. R. A. — The conglutination phenomenon. II — The technique of the conglutinating complement absorption test compared with the haemolytic complement fixation test. *J. Hyg.* 45:490-496, 1947.
9. LACHMANN, P. J. — Conglutinin and immunoconglutinins. *Advances Immunol.* 6:479-527, 1967.

Recebido para publicação em 14/12/1970.