

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO IMUNOLÓGICO DA BLASTOMICOSE DE LUTZ (BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA)*

CELESTE FAVA NETTO **

Numerosos pesquisadores têm dedicado seus esforços ao estudo imunológico das micoses profundas. Procuraremos fazer revisão limitada da literatura pertinente ao assunto, para justificarmos nossos estudos na blastomicose de Lutz.

Convém assinalar que não pretendemos fazer revisão da literatura referente a tôdas as micoses profundas, mas somente àquelas que, dada sua frequência ou gravidade, mereceram estudos mais pormenorizados dos pesquisadores. Sabemos, também, que não poderíamos fazer revisão completa do assunto, mas a introdução terá por finalidade somente a de situar a imunologia da blastomicose sul-americana dentro do campo mais vasto, e já em parte explorado, da imunologia das micoses profundas.

Coccidioidomicose — Esta micose era considerada rara e grave, levando freqüentemente à morte, até que, de 1935-1938, DICKSON & GIFFORD (1938) fizeram descoberta revolucionária, qual seja, a existência da coccidioidomicose-infecção, que se manifesta na maioria das vezes como moléstia respiratória benigna. Os estudos clínicos, associados aos imunológicos, permitiram a individualização das várias formas de coccidioidomicose, sendo que SMITH (1943) fez a seguinte classificação clínica:

A — Infecção inicial ou primária

- 1) Inaparente
- 2) Respiratória aguda, “gripal” ou “pneumônica”

* Tese para concorrer à docência-livre de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo. São Paulo, 1960.

** Assistente do Departamento de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P. (Diretor: Prof. Carlos da Silva Lacaz).

Recebido para publicação em 19 de novembro de 1960.

- 3) Cada um dos tipos anteriores ou ambos, associados com eritema nodoso ("San Joaquin fever", "Valley fever", "desert fever", "desert rheumatism")
- 4) Forma pulmonar escavada

B — Forma progressiva (secundária; com infecção disseminada; "San Joaquín Valley disease")

Posteriormente, WILSON & colab. (1953) descreveram caso de coccidioidomicose cutânea primária, dando individualização a esta nova manifestação clínica, através de vários critérios. Estas várias formas clínicas da coccidioidomicose se encontram bem individualizadas no livro de WILSON (1957) e também no de CONANT & colab. (1954).

Na coccidioidomicose as seguintes provas imunológicas têm sido empregadas correntemente:

- a) Reação de fixação do complemento
- b) Reação de precipitação
- c) Prova intradérmica ou reação à Coccidioidina

O antígeno utilizado é o mesmo para todas as provas. Corresponde à coccidioidina, filtrado de cultura de *Coccidioides immitis* em meio sintético, cuja padronização é referida por SMITH & colab. (1950). O componente antigênico é um polissacarídeo que pode ser purificado a partir do filtrado. No entanto, o polissacarídeo purificado funciona como antígeno somente nas reações de precipitação e intradérmica. Somente o filtrado total funciona como antígeno na reação de fixação do complemento, segundo HASSID & colab. (1943). Também o aquecimento lhe retira o poder de fixar o complemento (WILSON, 1957; SMITH & colab., 1950). Segundo alguns pesquisadores, todas as amostras de *Coccidioides immitis* são capazes de produzir coccidioidina-antígeno, quando cultivadas nas condições já indicadas. Haveria falhas incontrolláveis, como por exemplo, quando vários frascos de culturas são semeados com a mesma amostra e nas mesmas condições, um dos frascos poderá não revelar poder antigênico no filtrado ou acusar somente poder antigênico muito fraco (SMITH & colab., 1950). Segundo outros, há diferenças no que diz respeito à quantidade e rapidez de liberação do polissacarídeo, por diferentes amostras (PAPPAGIANIS & KOBAYASHI, 1958). A coccidioidina não diluída é estável por 10 anos e diluída o é por vários meses (SMITH & colab., 1948; 1950).

As seguintes conclusões foram obtidas pelo emprego das provas imunológicas referidas:

1) A sensibilidade à coccidioidina é do tipo "bacteriano" comum e não se transmite passivamente. Uma vez estabelecida, é muito duradoura, podendo atenuar-se só lentamente. Experiência limitada não apóia a teoria de que a reexposição a ambiente coccidióidico exerça maior efeito sobre a manutenção da sensibilidade. Sensibilidade pequena à coccidioidina geralmente se associa à disseminação da moléstia. O índice de sensibilidade apresenta valor prognóstico, porque em vários casos notou-se aumento da sensibilidade acompanhando a melhora dos pacientes. A coccidioidina não é significativamente antigênica e uma prova positiva indica coccidioidomicose. As provas intradérmicas não promovem a formação de anticorpos humorais e podem ser realizadas antes da pesquisa destes. Ao realizar a prova, deve-se tatear a sensibilidade dos pacientes, pois reações fortemente positivas podem ocorrer; estas, no entanto, não pioram lesões quiescentes, não provocam disseminação, nem prejudicam a moléstia aguda inicial (SMITH & colab., 1948). Aproximadamente 60% das infecções são assintomáticas, revelando-se somente pela prova da coccidioidina. A conversão da coccidioidina se dá em 87% dos casos na 1.^a semana da infecção e em 99% dos casos na 2.^a semana. Pacientes com coccidioidomicose primária e eritema nodoso podem reagir fortemente a 0,1 ml de coccidioidina a 1/1.000. Também uma primeira prova positiva na diluição de 1/100 pode agravar o eritema nodoso ou mesmo provocar o seu aparecimento. Pacientes hipersensíveis à coccidioidina podem reagir cruzadamente à histoplasmina e à blastomicetina, mas em menor intensidade (SMITH & colab., 1949). É conveniente, portanto, nos casos duvidosos, realizar provas intradérmicas com os três antígenos simultaneamente. Provas repetidas não condicionam o aparecimento de anticorpos cuti-sensibilizadores, nem de anticorpos humorais (CONANT & colab., 1954).

2) Em mais de 21.000 provas simultâneas, de precipitação e de fixação do complemento, SMITH & colab. (1950) verificaram que elas revelam menos que 10% das formas pulmonares assintomáticas e mais que 90% das formas pulmonares sintomáticas. Estas provas confirmaram 3/5 das cavidades pulmonares coccidióidicas e 99% das formas disseminadas. Entre 3.219 pacientes com infecção primária, somente precipitinas foram demonstradas em 44% dos casos e a prova de fixação do complemento foi positiva, isoladamente, em 22% dos casos. Estas provas sorológicas foram positivas somente após o aparecimento da alergia, desde que não houvesse disseminação associada com anergia. Portanto, a prova à coccidioidina serve como eliminatória. Para o diagnóstico, a

prova de precipitação é mais útil, se bem que na 1.^a semana somente metade dos casos apresenta reação positiva. Em duas semanas, 90% dos casos são positivos. Muitos soros perdem as precipitinas dentro de 3 meses. A prova de fixação do complemento continua a positivar-se por 3 meses. A sua negatificação é lenta, 1 ano ou mais.

O título em anticorpos fixadores do complemento aumenta com a gravidade do caso. Enquanto que se encontra título superior a 1/16, menos que uma vez em 40 casos de coccidioidomicose localizada, em casos de coccidioidomicose disseminada, mais que a metade apresenta títulos superiores a 1/16. Os pacientes que, ao lado da reação de fixação do complemento com altos títulos, apresentarem reação intradérmica negativa, têm mau prognóstico. SMITH & colab. (1950) demonstraram ainda anticorpos precipitantes e fixadores do complemento no líquido, em casos de comprometimento nervoso e ainda em líquidos pleurais e peritoniais nos casos de comprometimento dessas serosas. COHEN (1949), estudando a coccidioidomicose em crianças, apresenta conclusões semelhantes.

Histoplasmosse — Também nesta infecção micótica, nossos conhecimentos se iniciaram pela forma grave, progressiva e fatal. Os pacientes, ao lado de quadro infeccioso, apresentam perda de peso, hepatosplenomegalia, anemia, leucopenia e, nas crianças, sinais de comprometimento intestinal. A maioria dessas manifestações indica comprometimento generalizado do S.R.E. Nos adultos ela dura de 3 semanas a 8 meses, mas alguns casos ficam crônicos durante anos, para depois morrerem em poucas semanas, por ocasião de disseminação da moléstia.

Segundo WILSON (1957), a histoplasmosse constitui exemplo dos mais evidentes, de que ainda são possíveis progressos rápidos nos conhecimentos médicos, pois nos últimos 10 anos, os que se referem a essa micose, sofreram impulso extraordinário. Realmente, agora sabemos que, em determinadas áreas endêmicas, numerosas pessoas se infetam pela inalação de esporos de *Histoplasma capsulatum* e, apesar de raramente se tornarem enfêrmas graves, com perigo de vida, a maioria mostra uma ou outra evidência de ter tido a moléstia. Segundo WILSON ainda, foi CHARLES E. SMITH, o grande estudioso da imunologia da coccidioidomicose, quem sugeriu poder ser a histoplasmosse a causa de muitas das calcificações pulmonares não tuberculosas, encontradas na população da parte centro-leste dos Estados Unidos. Inquéritos epidemiológicos, realizados com a prova da histoplasmina, vieram confirmar aquela

suposição e, ainda mais, revelar que a histoplasmose existe endêmica-mente, em maior ou menor proporção, no mundo todo.

Vejam, no entanto, como a caracteriza clinicamente FURCOW (1956), um dos grandes conhecedores da histoplasmose. Distingue este autor as seguintes formas clínicas:

A — Histoplasmose grave

- 1) Tipo progressivo crônico (de reinfecção ou cavitário).
- 2) Tipo agudo progressivo. Dura em média 6 semanas e é fatal. É o tipo geralmente descrito na literatura.
- 3) Tipo agudo epidêmico. Pneumonite disseminada. Não é progressivo e evolui para a cura. Ocorre em adultos, virgens da infecção.

B — Histoplasmose moderadamente grave. Dura de 5-15 dias, com sintomatologia semelhante à da influenza. Recidivas ocorrem com certa freqüência.

C — Histoplasmose benigna. Sintomas de influenza, durando 1-4 dias. Supõe-se que ocorra infiltrado nodular em cerca de 2/3 dos casos.

D — Histoplasmose assintomática

Refere ainda que provas se acumulam, indicando haver reinfecção em alguns casos. Em muitos, parece que há recaída da histoplasmose já existente. Esta classificação foi possível, dada a grande experiência do Autor, no estudo dessa infecção. CONANT & colab. (1954) e WILSON (1957) distinguem menor número de variedades clínicas da histoplasmose. Todos, no entanto, assinalam a existência de formas pulmonares assintomáticas, formas pulmonares benignas e finalmente, a forma progressiva, de disseminação. Admitem, também, a porta de entrada cutânea, que segundo WILSON (1957) apresentar-se-ia com caracteres semelhantes aos da esporotricose.

Vejam quais os aspectos imunológicos estudados na histoplasmose que, em conjunto com os dados clínicos, permitiram a conceituação que acabamos de expor. Devemos, inicialmente, assinalar que as provas imunológicas foram estudadas por vários grupos de pesquisadores e, em consequência, os resultados conseguidos não fornecem conclusões tão claras quanto as da coccidioidomicose, cuja imunologia foi estudada, quase que inteiramente, pela

escola de SMITH. As provas imunológicas, já utilizadas no estudo da histoplasmose, são: a reação intradérmica, a reação de fixação do complemento, a reação de precipitação, a reação de floculação de partículas de colódio e a aglutinação de hemácias sensibilizadas.

O antígeno mais comumente utilizado na reação intradérmica é a histoplasmina, filtrado de cultura da fase miceliana do *Histoplasma capsulatum*, em meio sintético. EMMONS & colab. (1945) referiram o meio sintético de SMITH para o preparo da histoplasmina e também da blastomicetina, coccidioidina e haplosporangina, que utilizaram no estudo de reações cruzadas. PATES (1948) demonstrou que é possível obter da histoplasmina, por purificação, frações protéicas e polissacarídicas, sendo que a fração polissacarídica se revelou mais específica nas reações intradérmicas. CROSS & HOWEL (1948) citaram o isolamento de fração polissacarídica pura, a partir da histoplasmina e em seus resultados verificaram que esta fração dava provas positivas, tanto em cobaios com histoplasmose, como também naqueles com blastomicose norte-americana por infecção experimental. Sugeriram, então, que o princípio ativo da histoplasmina é, em parte, polissacarídeo, e que se fôr determinado o título exato, êle será relativamente específico para animais infectados por *Histoplasma capsulatum*.

DYSON & EVANS (1954), com o propósito de encontrar antígenos que não apresentassem reações cruzadas como a histoplasmina obtida da fase miceliana, fizeram culturas da fase leveduriforme em meio líquido e extraíram antígenos das células leveduriformes do *H. capsulatum*. Os antígenos, extratos não purificados das células leveduriformes, não foram satisfatórios, mas frações isoladas do sobrenadante das culturas pareceram ser específicos. Os antígenos, parcialmente purificados, são constituídos principalmente por polissacarídeos e apresentam atividade biológica até na quantidade de 1 micrograma.

Os antígenos empregados nas reações de fixação do complemento são vários. O antígeno inicialmente utilizado foi simplesmente a histoplasmina, filtrado de culturas da fase miceliana do *H. capsulatum*.

Em 1947, SALVIN referiu o emprêgo de células leveduriformes mortas pelo formol, como antígeno. SASLAW & CAMPBELL (1948; 1949) e CAMPBELL & SASLAW (1948) descreveram o emprêgo de células leveduriformes mortas pelo calor, bem como extrato obtido por trituração de células leveduriformes. Êstes antígenos foram empregados com soros animais, para estudo de suas propriedades,

padronização, reações cruzadas e ainda com soros humanos. SALVIN (1950) também utilizou células leveduriformes para estudo das relações sorológicas entre vários cogumelos. Neste mesmo ano, SASLAW & CAMPBELL empregaram extrato de células leveduriformes para novos estudos com soros humanos. GRAYSTON (1952) fez boa revisão da imunologia da histoplasnose, publicando seus resultados. Empregou, como antígenos, células leveduriformes, sobrenadante de células leveduriformes trituradas e histoplasmina. Segundo seus estudos, as células leveduriformes mortas pelo calor se revelaram melhor antígeno. CAMPBELL (1953) fez tentativa de purificação dos antígenos obtidos da fase miceliana e da fase leveduriforme. HAZEN & TAHLER (1953) publicaram os resultados obtidos com soros humanos, empregando como antígeno células leveduriformes e extrato, por trituração, de células leveduriformes. CAMPBELL & BINKLEY (1953) utilizaram, como antígeno, extrato de células leveduriformes. SASLAW & CAMPBELL (1953) usaram células leveduriformes e histoplasmina. SCHUBERT & colab. (1953) estudaram 10 lotes separados de histoplasmina, para determinar a antigenicidade relativa dos mesmos em provas de fixação do complemento. SALVIN & FURCOLOW (1954) utilizaram células leveduriformes. SALVIN & colab. (1954) empregaram, como antígenos, células leveduriformes, extrato de células leveduriformes e histoplasmina. Em 1954, SORENSEN & EVANS descreveram o preparo de fração antigênica livre de proteína, para reação de fixação do complemento e que se revelou específica com soros de coelhos infetados. HAZEN & GREENE (1956) empregaram células leveduriformes mortas pelo calor e extrato de células leveduriformes (lavadas e secas em acetona). Em 1957, HAZEN & GREENE, além das células leveduriformes, utilizaram histoplasmina (filtrado de fase miceliana). Em 1957, LABZOFFSKY & colab. extraíram do *H. capsulatum*, por métodos físicos e químicos, 8 frações antigênicas, das quais 3 eram específicas para *H. capsulatum*. Em 1957, SCHUBERT & AJELLO, estudando as variações de antigenicidade em várias amostras de *H. capsulatum*, empregaram células leveduriformes. Verificaram que há variações na antigenicidade de várias amostras e aconselham a experimentação de numerosas amostras para encontrar a que ofereça antígeno mais potente.

Na prova de precipitação, os antígenos utilizados pouco têm variado. Em 1948, PATES utilizou frações obtidas da histoplasmina. Em 1953, CAMPBELL & BINKLEY usaram a histoplasmina, filtrado de cultura da fase miceliana. Com o mesmo antígeno trabalharam SALVIN & FURCOLOW (1954) e SALVIN & colab. (1954).

Na prova de floculação de partículas de colódio, também a histoplasmina (filtrado de cultura da fase miceliana) foi o antígeno utilizado por CAMPBELL & BINKLEY (1953) e SASLAW & CAMPBELL (1953), segundo técnica padronizada por SASLAW & CAMPBELL (1948; 1949; 1950).

A prova de aglutinação de hemácias sensibilizadas foi utilizada somente por NORDÉN (1949) que sensibilizou hemácias de carneiro com histoplasmina, em trabalho experimental.

Os achados que o estudo imunológico da histoplasmose oferece serão revistos brevemente a seguir.

A prova intradérmica à histoplasmina permitiu a realização de numerosos inquéritos epidemiológicos, dos quais indicaremos os seguintes: em 1948, por EDWARDS & colab.; em 1948, por FURCLOW & colab.; em 1949, por BEADENKOFF & colab.; em 1957, por EDWARDS & PALMER e o trabalho de LACAZ & colab. (1955), onde se encontram resultados de vários inquéritos realizados no Brasil. Os inquéritos epidemiológicos permitiram conhecer a extensão e a localização da endemia histoplasmótica nos Estados Unidos, com organização de mapas como o que se encontra no livro de CONANT & colab. (1954), reproduzido de PALMER. Demonstrou-se que, nos Estados Unidos, existem regiões em que a histoplasmose-infecção atinge 80% das pessoas.

Inquéritos epidemiológicos têm sido feitos em quase todos os países do mundo e, onde eles não se realizaram ainda, a publicação de casos clínicos indica ser a histoplasmose, micose ubiqüitária. Além de permitir verificar a distribuição geográfica dos reatores à histoplasmina, da relação existente entre calcificações pulmonares e histoplasmose-infecção, a prova intradérmica veio demonstrar a existência de infecções benignas, que de outro modo seriam classificadas principalmente como gripe, pois os raros casos benignos, em que o cogumelo foi isolado, representam o resultado de pesquisas exaustivas. A prova intradérmica tem valor relativo quanto ao diagnóstico, devido à elevada percentagem de reatores entre a população normal. No entanto, ela é de grande valor para o diagnóstico, quando se trata de epidemia de histoplasmose. Estudos de epidemias de histoplasmose foram feitos por FURCLOW & GRAYSTON (1952), FURCLOW & colab. (1955), LEHAN & FURCLOW (1957) e FURCLOW (1958). Outra questão, relacionada com a prova intradérmica, foi a de se saber da possibilidade de uma prova condicionar a positividade de outra ou, ainda, o aparecimento de anticorpos circulantes. Este assunto se encontra explorado nas

publicações de PRIOR & SASLAW (1952), SASLAW & CAMPBELL (1953) e SALVIN & colab. (1954). Tais trabalhos permitiram chegar à conclusão de que a reação intradérmica, negativa à histoplasmina, não condiciona a positividade de prova posterior. O mesmo acontece com várias provas seguidas, num mesmo indivíduo. Uma série de provas negativas também não estimula a produção de anticorpos circulantes. No entanto, série de provas intradérmicas em indivíduos histoplasmino-positivos estimula a produção de anticorpos circulantes, reveláveis através das provas de fixação do complemento e aglutinação de partículas de colódio. Tudo leva a concluir que os pacientes, positivos à histoplasmina, reagem à prova intradérmica, como se fosse injeção de reforço.

A pesquisa de anticorpos circulantes na histoplasiose permitiu chegar às seguintes conclusões: só existem anticorpos fixadores do complemento, em indivíduos tidos como normais, naqueles que são histoplasmino-positivos. O título em anticorpos fixadores do complemento é significativamente mais elevado nos casos agudos que nos crônicos. Há queda no teor de anticorpos, com a melhora do paciente. Há casos de histoplasiose comprovada em que os anticorpos fixadores do complemento estão ausentes (CAMPBELL & SASLAW, 1949). Para estes AA. a prova de aglutinação de partículas de colódio, sensibilizadas com histoplasmina, teve comportamento igual à prova de fixação do complemento.

GRAYSTON (1952) chegou às seguintes conclusões: os casos de histoplasiose comprovada reagiram positivamente em altos títulos, sendo que 2 casos que apresentaram títulos baixos eram de histoplasiose crônica generalizada, próximos da morte. O título de anticorpos fixadores de complemento vai caindo com a melhora dos pacientes. Os anticorpos demoram até 8 meses para desaparecer, na sua série de casos. No mesmo trabalho, apresentou o estudo de 5 membros de uma família, que se infetaram na mesma época: 3 possuíam altos níveis de anticorpos; 2 apresentavam níveis baixos, acompanhados de infiltrados pulmonares assintomáticos. Houve queda brusca do nível de anticorpos em 1 caso, coincidindo com a disseminação da moléstia. O paciente melhorou e se recuperou em alguns meses, mas o seu soro nunca mais se apresentou positivo à prova de fixação do complemento. A queda gradual e regular nos níveis de anticorpos nos outros membros da família acompanhou a recuperação da lesão pulmonar por calcificação.

Em 1953, HAZEN & TAHLER referiram a ocorrência de reações de fixação do complemento negativas em casos comprovados de

histoplasmose. No mesmo ano, CAMPBELL & BINKLEY publicaram extenso trabalho, cujas conclusões são as seguintes: em 10 casos de lesões pulmonares primárias e limitadas, os níveis de anticorpos eram elevados, entre 1/80 e 1/2.560, apareceram muito cedo e os níveis mais altos foram encontrados nas seis primeiras semanas de infecção. Pelo 4.º mês, o título foi de 1/20 ou menor. Nos casos crônicos generalizados (sòmente 3 casos), os títulos, em anticorpos fixadores do complemento, se mantiveram altos durante o período de observação, entre 1/160 e 1/2.560. Nos casos generalizados, associados com endocrinopatias (10 casos) havia, em todos, título persistentemente baixo em anticorpos, entre 1/5 e 1/80; muitas vèzes não se conseguiu demonstrar a presença de anticorpos pela fixação do complemento. Noutra série de 14 casos, êstes AA. não demonstraram anticorpos fixadores do complemento. Êstes casos apresentavam considerável variação na sintomatologiá clínica; 8 casos de forma pulmonar benigna, do grupo, foram positivos pela prova de aglutinação de partículas de colóidio; outros 4 casos de lesões cutâneas, únicas demonstráveis, também reagiram positivamente a essa prova. Os outros 2 casos em que as lesões eram de 2 e 14 anos de duração, foram negativos por ambas as provas. SALVIN & FURCOLOW (1954) chamaram a atenção para a prova de precipitação, que pode ser positiva, na ausência de anticorpos fixadores do complemento, em casos de histoplasmose benigna. Estudaram 8 pacientes: 3 mostraram sòmente precipitinas durante 2-3 meses; 3 com moléstia mais grave, apresentaram anticorpos precipitantes e fixadores do complemento, êstes observados durante mais tempo; 2 outros pacientes crônicos, com anticorpos fixadores do complemento e precipitinas sempre presentes.

FURCOLOW & colab. (1955), numa epidemia de histoplasmose, verificaram que os anticorpos fixadores do complemento persistiram até 8 meses nos casos mais graves. SASLAW & CAMPBELL (1950) acreditam que a ausência de anticorpos circulantes em altos títulos em infecção ativa indica mau prognóstico. FURCOLOW (1956) referiu que as provas sorológicas são positivas na fase aguda e os títulos caem com a melhora dos pacientes. Os títulos geralmente são elevados durante 1 ano, mas podem assim permanecer até 5 anos, nas formas pulmonares extensas ou de comprometimento ganglionar de cura lenta. Em alguns casos de histoplasmose comprovada, as provas sorológicas continuam a ser negativas, por desconhecidas razões. As precipitinas se positivam primeiro. Títulos elevados de anticorpos fixadores do complemento ou falha no desaparecimento das precipitinas indicam mau prognóstico.

Blastomicose norte-americana — Na revisão da imunologia da blastomicose norte-americana vamos inicialmente chamar a atenção para a classificação clínica de suas manifestações, feita por WILSON (1957). Distingue êste Autor as seguintes formas clínicas:

- a) Blastomicose cutânea primária. Forma extremamente rara, da qual se conhecem, com certeza, 4 casos descritos por WILSON & colab. (1955)
- b) Blastomicose pulmonar primária
- c) Blastomicose disseminada
- d) Blastomicose cutânea crônica, localizada

As provas imunológicas utilizadas no estudo da blastomicose norte-americana têm sido: reação intradérmica, fixação do complemento, precipitação, floculação de partículas de colódio e aglutinação de hemácias sensibilizadas.

Como antígeno para a reação intradérmica, MARTIN & colab. (1936) utilizaram células leveduriformes mortas pelo calor. MARTIN & SMITH (1939) referiram sua experiência com êste antígeno.

PECK & colab. (1940) estudaram o isolamento e a purificação de fração polissacarídica do *Blastomyces dermatitidis*, crescido a 37°C. A purificação se fez a partir do extrato aquoso das células. Êste polissacarídeo deu, em paciente de blastomicose, reações mais evidentes e mais precoces do que as obtidas com a fração protéica ou vacina.

EMMONS & colab. (1945) prepararam blastomicetina pelo cultivo do cogumelo no meio sintético de SMITH. SCHAWARZ & BAUM (1952) utilizaram células leveduriformes mortas pelo calor. FRIEDMAN & CONANT (1953), em trabalho experimental, empregaram blastomicetina-filtrado e também células leveduriformes, para reações intradérmicas em cobaios infetados experimentalmente. MARTIN (1953) experimentou, em cobaios infetado pelo *Blastomyces dermatitidis*, sobrenadante de células leveduriformes após ruptura sônica e simples sobrenadante de suspensão de células leveduriformes. DYSON & EVANS (1954) referiram que não conseguiram isolar bons antígenos do extrato de células do *B. dermatitidis*, mas conseguiram polissacarídeo do líquido de cultura, que se mostrou mais específico. Em inquérito epidemiológico, HARRIS & colab. (1957) empregaram vacina fornecida por CONANT, a que chamaram blastomicetina.

Na reação de fixação do complemento, MARTIN (1935) empregava células leveduriformes como antígeno. O mesmo antígeno

serviu para pesquisas do referido Autor realizadas em colaboração com SMITH & DURHAN (1936) e com SMITH (1939a; 1939b). PECK & colab. (1940), estudando a purificação de polissacarídeos a partir da extração aquosa de *B. dermatitidis*, verificaram que duas frações polissacarídicas fixavam o complemento em presença de sôro imune de coelho. O mesmo acontecia com o extrato aquoso total, que se mostrava mais potente.

SASLAW & CAMPBELL (1948) empregaram células leveduriformes mortas pelo calor. CAMPBELL & SASLAW (1948; 1949) experimentaram antígeno solúvel extraído por trituração de células leveduriformes. SALVIN (1949) utilizou células leveduriformes e em 1950 empregou o mesmo tipo de antígeno. HAZEN & TAHLER (1953) utilizaram 2 tipos de antígenos: células leveduriformes e extrato de células leveduriformes por trituração. CAMPBELL & BINKLEY (1953) publicaram os resultados obtidos com antígeno, extraído por trituração, de células leveduriformes. FRIEDMAN & CONANT (1953) empregaram 3 tipos de antígenos, a saber: filtrado de cultura da fase miceliana, suspensão de células leveduriformes e purificado protéico, após desintegração das células leveduriformes pelo ultra-som. MARTIN (1953) experimentou sobrenadante e purificados polissacarídicos de células leveduriformes, bem como sobrenadante e purificado protéico e polissacarídico após tratamento das células, por ultra-som. Chegou a conclusão de que o melhor antígeno para fixação do complemento com soros humanos é o líquido sobrenadante total, após o tratamento das células pelo ultra-som. O carboidrato que se difundia rapidamente no sobrenadante das células não tratadas fixava complemento com sôro de coelho imune, mas não com sôro humano. HAZEN & GREENE (1956) experimentaram células leveduriformes e extrato salino de células leveduriformes lavadas e sêcas em acetona.

Na reação de precipitação, CAMPBELL & BINKLEY (1953) empregaram o filtrado de cultura de *B. dermatitidis*, a que chamaram blastomicetina. MARTIN (1953) referiu ter experimentado, nas provas de precipitação, extratos de células tratadas pelo ultra-som, extrato de células não tratadas e várias frações desses materiais. Todas se revelaram bons antígenos nas provas de precipitação, mas a fração precipitada ao nível de concentração alcoólica de 45% dava maior quantidade de precipitado comparativamente às outras.

A prova de floculação de partículas de colóidio, sensibilizadas pela blastomicetina, foi experimentada por CAMPBELL & BINKLEY (1953).

A prova de aglutinação de hemácias sensibilizadas foi utilizada por MARTIN (1953), que verificou ser o líquido sobrenadante de células não tratadas por ultra-som e a fração desse líquido, precipitada ao nível alcoólico de 73%, bons antígenos para sensibilização de hemácias; a reação, no entanto, era muito sensível e inespecífica, sendo abandonada.

As conclusões a serem tiradas dessa revisão da imunologia da blastomicose norte-americana são as seguintes: não se tem muita certeza sobre o melhor antígeno a ser empregado nas reações intradérmicas. Parece que os polissacarídeos se constituirão em melhores antígenos para este tipo de reação, segundo PECK & colab. (1940) e DYSON & EVANS (1954). No entanto, ainda em trabalhos recentes, encontramos o emprêgo de suspensão de células leveduriformes (HARRIS & colab., 1957). Não verificamos estudos que referissem o tempo de moléstia necessária à positivação da prova intradérmica. O mesmo acontece aos outros tipos de anticorpos. Este fato tem explicação no desconhecimento que ainda existe a respeito das formas iniciais da blastomicose norte-americana. WILSON (1957) referiu que, dos 4 casos de blastomicose cutânea primária, 2 foram submetidos às provas imunológicas e a prova intradérmica logo se tornou positiva, com altas diluições do antígeno. Em 1 dos casos, a reação de fixação do complemento foi negativa e noutro foi positiva, somente em título baixo. Todos os casos evoluíram para a cura.

Supõe-se que a blastomicose norte-americana tenha o mesmo modo de contágio que a histoplasmose e coccidioidomicose, isto é, a partir do cogumelo na natureza, fazendo-se o contágio por inalação da forma infetante do fungo. Esta conclusão é sugerida por HARRIS & colab. (1957), que realizaram inquérito epidemiológico no Estado de Carolina do Norte, através de reações intradérmicas e de fixação do complemento. Encontraram numa área, em que ocorrera pequena epidemia de blastomicose, 2,9% de reatores à prova intradérmica.

Os mapas de distribuição da moléstia são, no entanto, organizados ainda pela ocorrência de casos de blastomicose, como no trabalho de SCHWARZ & FURCOLOW (1955), no qual sugeriram também que as 3 infecções — histoplasmose, coccidioidomicose e blastomicose são adquiridas na natureza, por inalação e não se transmitem de homem a homem. Referiram, ainda, que as reações intradérmicas na blastomicose não são tão constantes como nas outras duas infecções, isto devido à falta de antígeno satisfatório ou à baixa capa-

cidade de produção de anticorpos pelo *B. dermatitidis*. Clinicamente, a maioria dos casos nas 3 infecções são assintomáticos e reveláveis pela prova intradérmica, que se torna positiva em 4-6 semanas. Sinais radiológicos são comuns na histoplasmose, menos comuns na coccidioidomicose e não foram vistos na blastomicose. Manifestações clínicas são evidentes na coccidioidomicose, demonstradas na histoplasmose e ainda não referidas na blastomicose.

MARTIN (1953), que indiscutivelmente tem grande experiência com a prova de fixação de complemento na blastomicose norte-americana, chega às seguintes conclusões: existe na superfície das células da fase leveduriforme do *B. dermatitidis*, polissacarídeo antigênicamente ativo e que se difunde rapidamente no líquido, quando as células são suspensas em salina. Este polissacarídeo fixa complemento só em presença de sêro de coelho, mas não em presença do sêro humano. Conclui, então, que a fixação do complemento com sêro humano é medida de anticorpos contra proteínas do cogumelo e, como eles aumentam com o progredir da moléstia, não têm função na cura da mesma. Já os anticorpos anti-carboidratos indicariam resistência do organismo. Registrou que, nos casos em que a fixação do complemento se mostrava positiva em altos títulos e a prova de hemaglutinação de título baixo, o prognóstico era mau. Nos casos contrários, com hemaglutinação positiva em altos títulos e a fixação em títulos baixos, o prognóstico era bom. Neste trabalho, em 69 casos comprovados de blastomicose, obteve 29% de reações de fixação do complemento negativas, empregando, como antígeno, extrato de células leveduriformes tratadas pelo ultra-som. Referiu que êstes resultados estão de acôrdo com sua experiência anterior, empregando células leveduriformes como antígeno.

SMITH (1949) publicou as conclusões do estudo imunológico de 40 casos de blastomicose, classificando-os em 4 grupos, por critério imunológico:

1) *Reação intradérmica positiva. Reação de fixação do complemento negativa.* Pacientes geralmente com lesões cutâneas localizadas, ou de formas pulmonares recentes. Prognóstico bom. Evolução boa em 9 casos, morte em 1.

2) *Prova intradérmica positiva. Fixação do complemento positiva.* Neste grupo há casos de boa evolução, em que os anticorpos fixadores do complemento vão desaparecendo com a melhora do paciente. Três mortes em um grupo de 10.

3) *Prova intradérmica negativa. Fixação do complemento positiva.* Geralmente, formas generalizadas, com mau prognóstico. Oito mortes em um grupo de 10.

4) *Prova intradérmica negativa. Fixação do complemento negativa.* Neste grupo referiu alguns casos em fase final, em anergia e casos recentes que ainda não desenvolveram anticorpos. Em 1 caso foi demonstrado excesso de antígeno circulante, com prova cutânea positiva por sôro imune.

Convém assinalar que o critério adotado pelo Autor foi exclusivamente o imunológico porque, pelo quadro dos resultados, podemos verificar que as manifestações clínicas não são levadas em consideração, havendo, por exemplo, formas disseminadas em todos os grupos. SCHWARZ & BAUM (1952) pesquisaram a possibilidade de contágio da blastomicose nos contactantes domiciliares e hospitalares de 12 pacientes. Adotaram como critérios: a) pesquisa da moléstia no contactante; b) evidências indiretas: história, reações intradérmicas e provas sorológicas. Empregaram, como antígeno, células leveduriformes mortas pelo calor. Não encontraram reações positivas em 48 contactantes domiciliares e em 58 contactantes hospitalares. Chegaram à conclusão de que o *B. dermatitidis* deve ser de baixa contagiosidade.

O problema das reações cruzadas — Complementando a revisão bibliográfica das três micoses profundas mais importantes na América do Norte, resta-nos referir os estudos realizados quanto à especificidade dos antígenos empregados nas várias provas imunológicas. Hoje sabemos que, para a maioria das reações empregadas no estudo imunológico dessas micoses, provas cruzadas se verificam em maior ou menor intensidade, chegando muitos AA. a preconizar que as reações imunológicas sejam feitas ao mesmo tempo com antígenos do *Coccidioides immitis*, do *Histoplasma capsulatum* e do *Blastomyces dermatitidis*, quando se pretende esclarecer a qual dêles é devida a infecção atual.

MARTIN (1935) já referia que, pela prova de fixação do complemento, dois soros de pacientes de blastomicose com anticorpos anti-*Blastomyces* não revelaram anticorpos anti-*Sporotrichum*, anti-*Coccidioides*, anti-*Histoplasma*, anti-*Geotrichum*, anti-*Monilia albicans* e anti-*Monilia candida*.

EMMONS & colab. (1945) se preocuparam com as reações cruzadas em provas intradérmicas, verificando que a diluição a 1/1.000 da histoplasmina dava reações positivas em cobaios experimental-

mente infetados com histoplasmose, blastomicose, coccidioomicose e haplomicose. Trinta e quatro de 136 pessoas hospitalizadas reagiram positivamente à histoplasmina e à blastomicetina. SALVIN (1947) referiu que, empregando células leveduriformes de *H. capsulatum* mortas pelo formol, não obteve reações cruzadas com 8 soros de coelhos e 10 soros humanos de coccidioomicose, 8 soros de coelhos de blastomicose e 4 soros de coelhos de monilíase, em prova de fixação do complemento. SASLAW & CAMPBELL (1948) verificaram pela prova de floculação de partículas de colódio que, quando as mesmas eram sensibilizadas com histoplasmina, soros anti-*Blastomyces dermatitidis* reagiam em fracas diluições, enquanto que soros anti-*Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporotrichum schencki*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* não reagiram. CROSS & HOWELL (1948) isolaram da histoplasmina polissacarídeo que dava reações positivas quando injetado intradèrmicamente, tanto em cobaios infetados por *H. capsulatum*, como naqueles infetados por *B. dermatitidis*. Sugeriram, no entanto, que a padronização do antígeno poderia torná-lo específico. PATES (1948) purificou, a partir de histoplasmina, fração polissacarídica que se demonstrou mais específica pela reação intradèrmica em coelhos experimentalmente inoculados com blastomicose.

SASLAW & CAMPBELL (1948), empregando como antígeno células leveduriformes de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *C. albicans* e soros hiperimunes de coelhos, demonstraram que: a) soros anti-*C. albicans*, *Sp. schencki* e *C. neoformans* davam reações negativas com antígeno de *H. capsulatum*, enquanto que soro anti-*B. dermatitidis* dava reação cruzada em título baixo; b) o antígeno *B. dermatitidis* tem baixa capacidade imunogênica em coelhos, produzindo soro com título de 1/40 no máximo. Três antígenos de *H. capsulatum* forneceram títulos de 1/80, 1/80 e 1/120 para o mesmo soro. Repetiram as experiências de SALVIN, mas continuaram a encontrar as reações cruzadas. CAMPBELL & SASLAW (1948), utilizando como antígeno extrato obtido por trituração de células leveduriformes, demonstraram ainda, por provas de fixação do complemento, reações cruzadas entre *Histoplasma* e *Blastomyces*, enquanto que soros anti-*B. brasiliensis*, anti-*Sp. schencki* e anti-*C. albicans* não reagiam com antígeno de *Histoplasma capsulatum*.

SALVIN (1949), fazendo absorção de soros de coelhos experimentalmente infetados e provas de fixação do complemento, demonstrou que o *B. dermatitidis* é o antígeno menos específico, mas quando injetado produz o anticorpo mais específico. O seu anti-

sôro reagiu com o antígeno específico e em menor grau com o *H. capsulatum* e foi absorvido pelo *H. capsulatum* e em menor grau pela *C. albicans* e *C. immitis*. O *H. capsulatum* produziu sôro que reagia igualmente com o antígeno homólogo e com *B. dermatitidis*, e que era absorvido por êste último antígeno e em menor grau por *C. albicans* e *C. immitis*. Êstes dois últimos antígenos produziram soros que reagiam em provas de fixação do complemento, sendo absorvidos com os outros 3 antígenos heterólogos. Os antígenos nas provas de fixação do complemento eram células leveduriformes de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. albicans* e coccidioidina. Em 1949, CAMPBELL & SASLAW, em 5 soros de histoplasmose, verificaram que três fixavam o complemento em títulos menores que com o antígeno homólogo, quando se usava como antígeno *B. dermatitidis*. Duas amostras de casos de blastomicose, com títulos de 1/10, não fixavam o complemento com antígeno de *H. capsulatum*. SALVIN (1950) estudou as relações antigênicas de *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Com provas de fixação do complemento e ainda absorção e titulação do "nitrogênio-anticorpo", chegou às seguintes conclusões:

- a) Reação positiva com *B. dermatitidis* pode indicar infecção por *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. albicans*, *C. neoformans* ou *C. immitis*.
- b) Reação positiva com *H. capsulatum* pode indicar infecção por *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* ou *C. albicans*.
- c) Reação positiva com *C. albicans* pode indicar infecção por outras espécies de *Candida*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis* ou *H. capsulatum*.

As reações cruzadas acima foram determinadas quantitativamente somente em coelhos hiperimunes. Os antígenos eram células leveduriformes. O grau de reações cruzadas com soros humanos não é necessariamente o mesmo.

CAMPBELL & BINKLEY (1953) referiram: a) reações cruzadas em casos de histoplasmose; assim, soros de doentes de histoplasmose podem fixar o complemento com o mesmo título com antígeno de *B. dermatitidis*, o mesmo não acontecendo com a coccidioidina; b) reações cruzadas em casos de blastomicose; os soros de doentes de blastomicose reagem com antígeno de *H. capsulatum*, mas não com a coccidioidina; c) reações cruzadas em casos de coccidioidomicose;

os soros de doentes de coccidioomicose reagem com antígeno de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*. Assinalaram, ainda, que a técnica e o antígeno empregados não influem nas reações cruzadas. Fizeram experiência com provas de fixação do complemento, empregando 4 tipos de antígenos: células leveduriformes do *Histoplasma capsulatum*; extrato do *Histoplasma capsulatum*; extrato do *Blastomyces dermatitidis* e coccidioidina. Verificaram, ainda, reações cruzadas com as provas de partículas de colódio sensibilizadas e nas de precipitação. FRIEDMAN & CONANT (1953) mostraram reações cruzadas entre *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis*, utilizando provas intradérmicas em cobaios experimentalmente infetados e também em alguns casos de blastomicose norte-americana. Os antígenos utilizados foram paracoccidioidina e blastomicetina-filtrado e também células leveduriformes. FRIEDMAN & CONANT (1953) estudaram as reações cruzadas entre *P. brasiliensis* e *B. dermatitidis*, efetuando provas de fixação do complemento, com 3 tipos de antígenos. Em soros de coelhos, as reações cruzadas foram mais frequentes. Em 20 casos de blastomicose norte-americana, 11 reagiram com o antígeno homólogo e 2 com o antígeno heterólogo. Em 11 casos de blastomicose sul-americana, 5 reagiram com um ou outro tipo do antígeno heterólogo. Nem todos os casos que apresentavam altos títulos com o antígeno homólogo reagiram com o antígeno heterólogo. MARTIN (1953) mostrou também reações cruzadas com soros de blastomicose e antígeno de *H. capsulatum*, obtido por tratamento das células leveduriformes por ultra-som. No mesmo trabalho, o Autor refere as provas cruzadas em reações intradérmica com cobaios infetados por *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*. SALVIN & FURCOLOW (1954) registraram reações cruzadas em casos de histoplasmose com antígenos de *B. dermatitidis* e de *C. immitis*, em provas de precipitação.

LABZOFFSKY & colab. (1957) isolaram 3 frações, entre 8 obtidas do *H. capsulatum*, que se mostraram específicas na reação de fixação do complemento.

Blastomicose sul-americana — Duas provas imunológicas têm sido estudadas na blastomicose sul-americana: a intradérmica e a fixação do complemento.

O estudo da prova intradérmica teve início com FONSECA FILHO & ARÊA LEÃO (1927), que a realizaram em dois pacientes, com filtrado de cultura do *P. brasiliensis*, em caldo (pH — 7,4) curante 6 meses, à temperatura ambiente, sendo que ambos os doentes reagiram positivamente. BASGAL (1931), com antígeno semelhante, obteve resultados positivos em 6 casos de blastomicose.

ALMEIDA & LACAZ (1941; 1942) empregaram, como antígeno, filtrado de cultura em Sabouraud-líquido de 19 amostras de *P. brasiliensis*. ALMEIDA & colab. (1945) chamaram Paracoccidioidina I ao antígeno idêntico ao anterior e com o qual realizaram provas intradérmicas em 22 doentes de blastomicose, obtendo 19 reações positivas; Paracoccidioidina II, suspensões da fase leveduriforme, do *P. brasiliensis*, a 1/10 e a 5% em solução salina fenicada e mortas pelo calor a 80°C, 1/2 hora, três dias consecutivos. Com este antígeno, realizaram provas em 22 pacientes com a suspensão a 1/10, obtendo 18 reações positivas e em 16 com suspensão a 5%, verificando 10 provas positivas; Paracoccidioidina III, pus ganglionar a 1/10 aquecido a 70°C, 1/2 hora, três dias sucessivos. Com este antígeno realizaram provas intradérmicas em 18 pacientes, com 9 resultados positivos. LACAZ (1945), referindo-se às experiências anteriores, salienta que o antígeno mais satisfatório foi a Paracoccidioidina I. SILVA (1945) experimentou, como antígeno, pus de testículo de cobaio experimentalmente infetado, rico em parasitas, diluído a 1/15 e aquecido a 75°C, 1 hora, três dias consecutivos. As reações intradérmicas foram positivas nos 8 casos experimentados. LACAZ (1948) utilizou células leveduriformes mortas pelo calor, de uma única amostra de *P. brasiliensis*. Em 26 pacientes verificou 18 reações positivas e duas duvidosas. LACAZ (1951) referiu o uso de Paracoccidioidina-filtrado, cultura de 10 amostras de *P. brasiliensis* em meio de SMITH. Verificou, com este antígeno, 10 reações positivas em 18 casos de blastomicose.

MACKINNON & colab. (1953) fizeram estudo experimental para padronização do antígeno a ser empregado em reações intradérmicas. O antígeno estudado foi o filtrado de amostra de *P. brasiliensis* em caldo-peptonado a 1% e glicosado a 2%. Demonstraram que ele era específico quando utilizado na diluição de 1/100. O mesmo antígeno foi empregado por HOUNIE & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE (1957). DEL NEGRO & FARIA (1954) fizeram estudo experimental, empregando células leveduriformes como antígeno. DOUAT & DIAS (1958) utilizaram filtrado após autoclavação de cultura de *P. brasiliensis* em Sabouraud-líquido, em temperatura ambiente, por 30 dias. CARVALHO (1958) usou paracoccidioidina-filtrado, cultura de 13 amostras de *P. brasiliensis* em meio de SMITH e paracoccidioidina-suspensão, células leveduriformes fornecidas pelo Prof. Lacaz.

A prova de fixação do complemento foi estudada desde 1916 quando MOSES empregou, como antígeno, extrato em solução fisiológica do cogumelo desenvolvido em ágar-Sabouraud, durante 6

meses. Obteve 8 reações positivas em 10 doentes estudados. GOMES & ASSUMPTÃO (1924) prepararam antígeno de culturas de 2 meses, triturando o cogumelo em gral, emulsionando-o em solução fisiológica e fervendo 5 minutos. A emulsão, livre dos grumos maiores, era o antígeno que foi empregado em estudo experimental e em 2 casos de blastomicose. FONSECA & ARÊA LEÃO (1927) empregaram como antígeno extrato salino de cultura do cogumelo em gelose, durante 2 meses e também filtrados de culturas do cogumelo em caldo, durante 6 meses. Estudaram a reação em 3 doentes de blastomicose e referiram ser o filtrado antígeno de grande sensibilidade. BASGAL (1931) obteve, com "antígeno-filtrado", 100% de reações positivas em 6 casos estudados. LACAZ (1945; 1949) utilizou filtrado de cultura de 20 amostras de *P. brasiliensis* em Sabouraud-líquido, durante 3 meses à temperatura de 28°C mais ou menos.

FAVA NETTO (1955), após estudar polissacarídeo extraído de células leveduriformes do *P. brasiliensis*, segundo técnica de NORDÉN, filtrado de cultura em meio de SMITH e células leveduriformes em suspensão, padronizou novo processo de preparo de polissacarídeo, por modificação da técnica de NORDÉN. Este antígeno revelou poder fixador bem maior que os outros e foi utilizado em reações de fixação do complemento quantitativas e por técnica de 50% de hemólise.

Dos estudos realizados com a reação intradérmica, chega-se à conclusão de que a referida prova tem valor muito relativo quanto à finalidade diagnóstica, pois, mesmo empregando antígenos não diluídos, não são raros os doentes de blastomicose que não reagem. Realmente, os primeiros pesquisadores se preocuparam com o aspecto diagnóstico do problema e muitos dos acima citados verificaram algumas reações inespecíficas, quando realizaram a prova com antígenos não padronizados, em pacientes de outras entidades mórvidas. Também a possibilidade de se verificarem reações cruzadas com outras micoses profundas foi pesquisada por LACAZ (1948), que demonstrou reações positivas em pacientes de blastomicose sul-americana, quando utilizava blastomicetina como antígeno, não verificando reações cruzadas com a coccidioidina. As reações cruzadas, que se verificam pela prova intradérmica, foram também referidas por MACKINNON & colab. (1953), CARVALHO (1958) e DOUAT & DIAS (1958).

LACAZ (1951), após chamar a atenção para a grande freqüência das lesões pulmonares na blastomicose sul-americana, aventa a hipótese da possível existência de "blastomicose-infecção". Em in-

quérito epidemiológico, que procedeu na ocasião, verificou 7,8% de reatores positivos em pacientes internados no Hospital das Clínicas, por outras causas. MACKINNON & colab. (1953) também realizaram inquérito epidemiológico em pacientes internados nos hospitais de Montevidéo, encontrando 2% de reatores positivos à paracoccidioidina padronizada. CARVALHO (1953) verificou, no Rio de Janeiro, a incidência de 4,2% de reatores à paracoccidioidina a 1/10 e 1,7% à paracoccidioidina a 1/100. DOUAT & DIAS (1958) verificaram 8% de reatores positivos. HOUNIE & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE (1957), utilizando paracoccidioidina a 1/10, realizaram inquérito epidemiológico em Montevidéo, observando 30 pessoas com 0% de reatores; em Mercedes, 12 pessoas com 25% de reatores e, em Rio Negro, 12 pessoas com 41,66% de reatores, indicando que, conforme se deslocavam para a zona das matas, maior o número de reatores à paracoccidioidina, entre as pessoas sadias. CARVALHO (1958) não pôde chegar a nenhuma conclusão quanto ao prognóstico da moléstia, empregando a prova intradérmica seriadamente nos pacientes.

Os primeiros trabalhos sôbre fixação do complemento na blastomicose sul-americana permitiram verificar que a maioria dos pacientes reagia positivamente à prova. Conclusões melhores puderam ser alcançadas com o trabalho de LACAZ (1949) e FAVA NETTO (1955), os quais verificaram serem positivas as provas em pacientes com moléstia de certa duração; serem negativas as provas em alguns pacientes graves; poderem acompanhar, pela sorologia, o tratamento dos pacientes; não poderem atribuir valor diagnóstico e prognóstico absoluto a tais provas.

Numerosos problemas existem ainda a ser explorados na imunologia da blastomicose sul-americana. Inclusive, acreditamos não ser possível efetuar corretamente a classificação de formas clínicas da moléstia, a não ser com o estudo conjunto da parte imunológica. É essencial sabermos, com certeza, se existem formas assintomáticas, como os inquéritos epidemiológicos sugerem e formas pulmonares agudas e benignas que passariam despercebidas, com diagnósticos de gripe ou de outras afecções pulmonares agudas. Precisamos procurar, no estudo conjunto das provas imunológicas, dados que talvez nos permitam conclusões quanto ao prognóstico, face a casos de blastomicose.

No presente trabalho trazemos novas contribuições ao estudo imunológico da blastomicose sul-americana. Estudamos, inicialmente, a possibilidade de execução de outras provas sorológicas, tais

como a aglutinação de hemácias de carneiro sensibilizadas, a flocculação de partículas de colesterol sensibilizadas e a reação de precipitação. Somente esta última prova pôde ser introduzida na rotina e então, estudada conjuntamente com as de fixação do complemento. Paralelamente, novos estudos imunológicos foram realizados com o antígeno por nós padronizado. Também incluímos, no presente trabalho, pesquisa quanto à possibilidade de transmissão inter-humana da paracoccidiodomicose, estudando familiares de doentes.

MATERIAL E MÉTODO

Em virtude de terem sido utilizados, no presente trabalho, alguns métodos já referidos em nossa tese de doutoramento, êles não receberão aqui descrição pormenorizada. Os novos métodos de que nos utilizamos é que serão bem explanados.

Neste capítulo vamos referir pesquisas sôbre o antígeno polisacarídico, que empregamos tanto nas reações de fixação do complemento, como nas de precipitação. São dados que poderiam ser, em parte, incluídos no capítulo de resultados. Serão aqui referidos porque apresentam interêsse que se relaciona mais de perto com o material e método das reações, que com as pesquisas de interêsse clínico que constituirão o capítulo de resultados.

ANTÍGENOS

Amostras empregadas. Poder fixador ótimo. — Preparamos, de acôrdo com técnica própria, já descrita em 1955, 22 partidas do antígeno polissacarídico. No Quadro I, referimos as amostras de *P. brasiliensis* utilizadas, dias de cultivo e poder fixador ótimo para 3 e 6 unidades de complemento (50% de hemólise). O poder fixador ótimo é aquela diluição do antígeno que revela maior título para sôro positivo, com determinada quantidade de complemento. Êle é determinado por titulação cruzada, empregando-se várias diluições de antígeno frente a várias diluições de sôro positivo.

Poder anticomplementar — Todos os antígenos por nós preparados, quando utilizados nas diluições ótimas, não apresentaram atividade de anticomplementar.

Conservação — O antígeno referido como n.º 3, no Quadro I, foi conservado estérilmente, em geladeira, sem preservativo, sem perder seu poder fixador e sem adquirir atividade anticomplementar, durante 3 anos.

QUADRO I
ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS

Parti- da	Amostras de <i>P. brasiliensis</i>	Dias de cultivo	Poder fixador ótimo	
			3 Unidades	6 Unidades
1	104, 395, SN, 18, 128, 265	62	1/50	1/50
2	104, 395, SN, 18, 128, 265 e AS.	70	1/100	1/100
3	104, 395, SN, 18, 128, 265 e AS.	64	1/100	1/100
4	104, 395, SN, 18, 128, 265 e AS.	64	1/100	1/50
5	104, 395, SN, 18, 265 e AS.	77	1/100	1/50
6	104, 395, 18, 265, SN e AS.	72	1/50	1/25
7	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	49	1/50	1/25
8	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	73	1/100	1/50
9	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	64	1/100	1/50
10	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	71	1/50	1/25
11	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	79	1/100	1/50
12	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	63	1/100	1/50
13	104, 395, 18, 265, SN, SM. e AS.	69	1/100	1/50
14	104, 395, 18, 265, SN, SM. e AS.	60	1/50	1/25
15	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	70	1/100	1/50
16	104, 395, 265, SN, 18, AS. e SM.	74	1/150	1/75
17	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	92	1/50	1/25
18	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM.	63	1/100	1/100
19	104, 395, 18, 265, SN, AS, SM. e PTL.	83	1/150	1/75
20	104, 395, 265, 18, SN, SM, AS. e PTL.	64	1/150	1/75
21	104, 395, 265, 18, SN, SM, AS. e PTL.	72	1/100	1/50
22	265, 395, 18, 104, SN, SM, AS. e PTL.	64	1/150	1/150

Antigenicidade — Procuramos verificar se o antígeno polissacarídico se comportaria como antígeno completo para o coelho. Para comparação utilizamo-nos também, nesta experiência, de vacina anti-blastomicótica, preparada no Departamento de Microbiologia e Imunologia e constituída de suspensão de células leveduriformes do cogumelo, mortas pelo calor. Um coelho recebeu por via endo-

venosa, com intervalo de 3 dias, polissacarídeo não diluído, nas seguintes quantidades: 0,25 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml e 1,5 ml. Após 11 dias de repouso, recebeu, ainda por via endovenosa, com intervalo de 5 dias, as seguintes quantidades de polissacarídeo, 1,0 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml e 1,5 ml. Soros obtidos desse coelho, antes do início da imunização, 9 dias após a última injeção da 1.^a série e 12 dias após a última injeção da 2.^a série, não mostraram presença de anticorpos anti-polissacarídeo, pelas reações de precipitação e de fixação do complemento. Outro coelho recebeu por injeções intramusculares, com intervalo de 5 dias, as seguintes quantidades de vacina: 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,0 ml, 2,0 ml, 2,0 ml, 2,0 ml e 2,0 ml. Soros obtidos desse coelho, antes da primeira injeção, 19 e 35 dias após a última injeção, não revelaram a presença de anticorpos pelas reações de precipitação e fixação do complemento.

Julgando que esta primeira tentativa pudesse funcionar como imunidade de base na produção de anticorpos para uma segunda série de injeções de antígeno, administramos por via endovenosa, em ambos os coelhos, com intervalo de 3 dias, as seguintes quantidades de vacina: 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 5 ml, 5 ml, 5 ml, 5 ml e 5 ml. Soros obtidos de ambos os coelhos aos 13, 22 e 48 dias após as últimas injeções foram negativos pelas reações de precipitação e fixação do complemento. O período de repouso entre a última injeção de polissacarídeo e a primeira da vacina foi, para o 1.^o coelho, de 15 dias. O período de repouso, entre as injeções intramusculares e as endovenosas de vacina, foi, para o 2.^o coelho, de 25 dias.

Antígenos de amostras separados — Outra pesquisa que realizamos foi com finalidade de verificar se era possível obter antígenos com as mesmas propriedades e com a mesma potência antigênica das 8 amostras que normalmente utilizamos. No Quadro II referimos as amostras, os dias de cultivo e o poder fixador ótimo para 3 e 6 unidades de complemento (50% de hemólise).

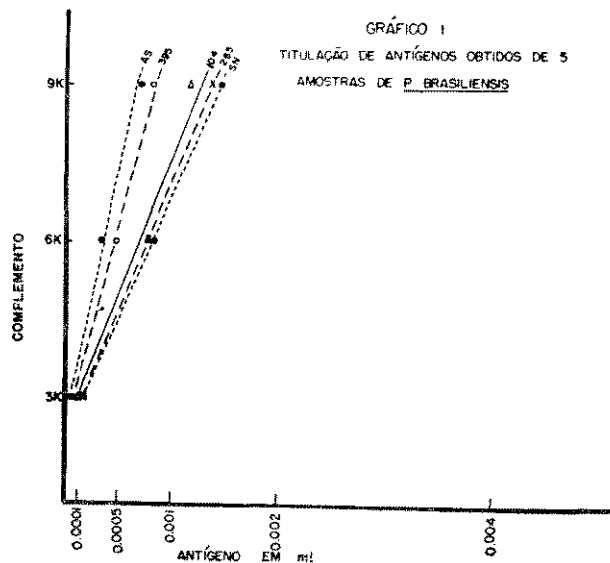
Procuramos também, analisar, por outro método, as potências relativas dos antígenos obtidos de cada amostra. Realizamos, segundo técnica aconselhada por ALMEIDA (1956), curvas de isofixação para 3 e 6 unidades de complemento. Tomamos, então, quantidade de sôro que se situava em posição em que os ramos verticais das curvas eram paralelos entre si, e procedemos à titulação de antígenos obtidos de 5 amostras com 3, 6 e 9 unidades de complemento (50% de hemólise).

QUADRO II
ANTÍGENOS OBTIDOS DE AMOSTRAS ISOLADAS

Amostras	Dias de cultivo	Poder fixador ótimo	
		3 unidades	6 unidades
PTL	64	1/50	1/50
104	64	1/50	1/25
395	64	1/150	1/75
SN	64	1/100	1/50
265	64	1/150	1/75
AS	64	> 1/150	1/150
18	64	> 1/150	> 1/150
SM	64	1/50	1/25

A inscrição das quantidades de antígeno necessárias para se obter 50% de hemólise, nos tubos reação, quando 3, 6 e 9 unidades de complemento estão inicialmente presentes, dá-nos as retas do gráfico 1 para as 5 amostras de antígeno.

Essas experiências preliminares indicavam diferenças na potência dos antígenos obtidos das várias amostras. Fizemos, então, nova verificação considerando a possibilidade de essa diferença correr por conta da suspensão celular (a 15%), por ser feita em relação ao volume úmido das células. No Quadro III estão referidos os dados



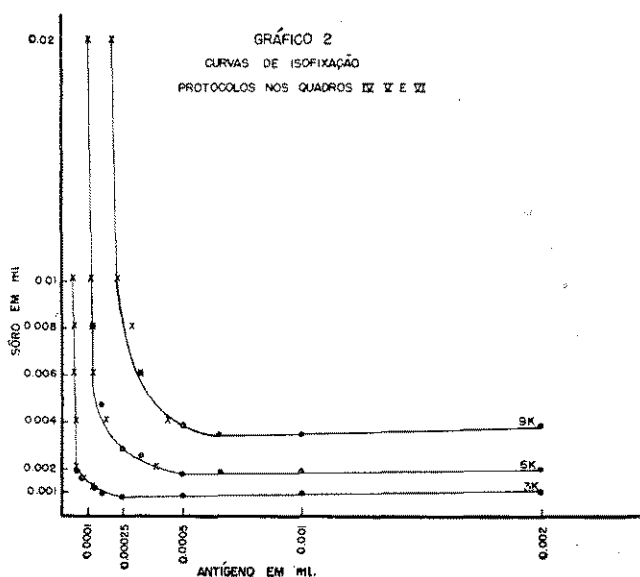
relativos a novo preparo de antígenos separados para cada amostra. A extração do polissacarídeo foi feita a partir de suspensão celular a 15% (de células úmidas), mas antes de se proceder a suspensão, as células foram deixadas secar e pesadas. A percentagem relativa ao peso das células correspondente para cada antígeno também se encontra anotada no quadro III.

QUADRO III

ANTÍGENOS OBTIDOS DE AMOSTRAS ISOLADAS

<i>Amostra</i>	<i>Dias de cultivo</i>	<i>Volume úmido e peso das células, depois de secas</i>	<i>Percentagem da suspensão</i>
SN	63	4,5 ml	15%
		2,8 g	9,5%
PTL	56	1,5 ml	15%
		1,0 g	10%
395	56	2,5 ml	15%
		1,0 g	6%
265	63	2,5 ml	15%
		0,5 g	3%
104	63	2,0 ml	15%
		0,5 g	3,75%
18	71	3,0 ml	15%
		1,7 g	8,5%
AS	71	5,0 ml	15%
		4,0 g	12%
SM	71	1,5 ml	15%
		0,4 g	4%

Para empregarmos na titulação dos antígenos quantidade de anticorpo adequada, fizemos curvas de isofixação para 3, 6 e 9 unidades de complemento, com o antígeno da partida 22 e mistura de soros positivos. Os Quadros IV, V e VI nos mostram as quantidades de soro e de antígeno empregados na obtenção das curvas de isofixação.



A quantidade de soro necessária para 50% de hemólise, com determinada quantidade de antígeno, foi determinada inscrevendo-se logaritmo das quantidades de soro contra logitos de hemólise, como aconselham RAPPORT & GRAF (1957). Podemos verificar que, para as maiores quantidades de antígeno, obtemos, para uma mesma quantidade deste, 2 tubos com hemólises parciais para duas diferentes quantidades de soro. Quando as quantidades de soro são grandes, para determinada quantidade obtemos 2 tubos ou mais de hemólises parciais com quantidades diferentes de antígeno. Usamos, então, a inscrição de logaritmo de antígeno contra logito de hemólise, para calcular a quantidade de antígeno necessária a 50% de hemólise com determinada quantidade de soro.

QUADRO IV
EXPERIÊNCIAS COM 3 UNIDADES DE COMPLEMENTO

<i>Antígeno</i>	<i>Soro positivo</i>											
	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002	0,0016	0,0012	0,0008	0,0004	0,00032	0,00024	0,00016
0,002	0	0	0	0	5	10	35	80	85	90	100	100
0,001	0	0	0	0	0	5	20	70	90	100	100	100
0,0005	0	0	0	0	0	10	25	45	85	100	100	100
0,00025	0	0	0	0	5	10	30	40	100	100	100	100
0,00016	0	0	0	0	5	10	30	70	90	100	100	100
0,000125	0	0	0	5	15	20	40	85	90	100	100	100
0,00008	5	10	15	20	25	45	75	85	90	100	100	100
0,0000625	20	20	40	45	35	85	75	100	100	100	100	100
0,00005	20	40	50	60	80	85	85	100	100	100	100	100
0,0000416	50	55	65	75	80	80	85	100	100	100	100	100
0,0000357	55	55	60	85	85	100	100	100	100	100	100	100

QUADRO V
EXPERIÊNCIAS COM 6 UNIDADES DE COMPLEMENTO

Antígeno	Sêro positivo											
	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002	0,0016	0,0012	0,0008
0,004	0	0	0	0	0	0	0	10	75	100	100	100
0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	50	80	100	100
0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	30	80	100	100
0,00066	0	0	0	0	0	0	0	10	35	75	80	100
0,0005	0	0	0	0	0	0	0	10	30	60	90	100
0,00033	0	0	0	0	0	10	10	20	65	90	100	100
0,00025	0	0	0	0	10	15	15	30	70	85	100	100
0,00016	25	20	20	20	20	25	35	60	85	100	100	100
0,000125	50	45	50	40	40	50	60	85	100	100	100	100
0,00008	60	60	75	85	80	80	90	100	100	100	100	100
0,0000625	90	100	90	90	100	100	100	100	100	100	100	100
0,00005	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

QUADRO VI
EXPERIÊNCIAS COM 9 UNIDADES DE COMPLEMENTO

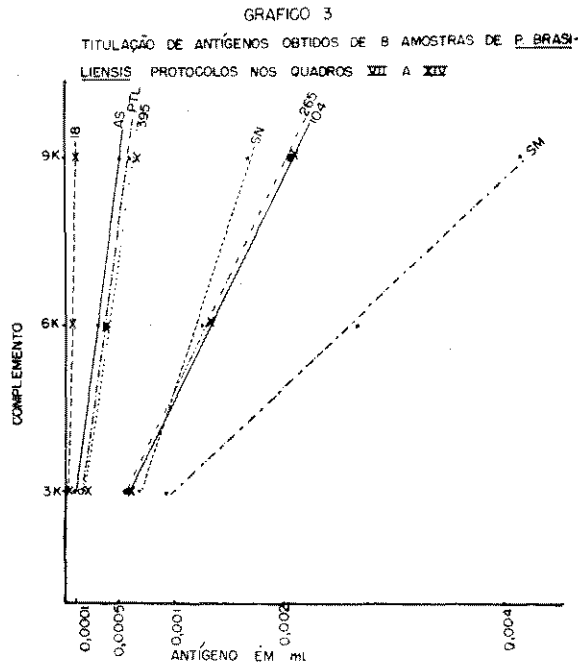
<i>Antígeno</i>	<i>Soro positivo</i>											
	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002	0,0016	0,0012	0,0008
0,004	0	0	0	0	0	0	15	55	90	100	100	100
0,002	0	0	0	0	0	0	10	45	100	100	100	100
0,001	0	0	0	0	0	5	15	35	90	100	100	100
0,00066	0	0	10	10	15	15	15	40	80	100	100	100
0,0005	0	0	0	0	10	10	20	45	90	100	100	100
0,00033	20	15	35	20	35	35	50	60	100	100	100	100
0,00025	70	50	50	75	85	90	100	100	100	100	100	100
0,00016	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,000125	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A inscrição das quantidades recíprocas de anticorpo e antígeno capazes de dar 50% de hemólise com 3, 6 e 9 unidades de complemento fornece-nos as curvas de isofixação representadas no gráfico 2.

Do ramo vertical das curvas podemos escolher quantidade de anticorpo capaz de revelar quantidade mínima de antígeno com 3, 6 e 9 unidades de complemento. Havendo nestas condições excesso de anticorpo, a fixação maior ou menor do complemento dependerá somente da maior ou menor quantidade de antígeno presente. Com tal excesso de anticorpo, titulamos os antígenos preparados, a partir das 8 amostras de *P. brasiliensis* com 3, 6 e 9 unidades de complemento. Os quadros VII a XIV nos dão os resultados de tais titulações. Com estes resultados calculamos as quantidades de antígeno necessárias para 50% de hemólise, inscrevendo em gráfico logaritmo de antígeno contra logito de hemólise, segundo RAPPORT & GRAF (1957).

A inscrição das quantidades de antígenos necessárias para 50% de hemólise, quando 3, 6 e 9 unidades de complemento estão inicialmente presentes, dá-nos o gráfico 3 em que estão representadas as 8 amostras tituladas. Pode-se

fácilmente verificar que há diferenças evidentes na potência dos antígenos obtidos de algumas amostras e, comparando-se os resultados com os do Quadro III, verifica-se que estas diferenças não têm explicação no pêso das células tomado como referência para o preparo da suspensão a ser autoclavada.



QUADRO VII
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO SN

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	10	55	85	90	100	100
6 K	0	5	50	85	100	100	100	100
9 K	5	20	75	100	100	100	100	100
A ₁ **	0	50	65	65	65	50	65	65
A ₂ **	90	100	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO VIII
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO 104

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	10	45	85	100	100	100
6 K	0	10	55	90	100	100	100	100
9 K	10	30	85	100	100	100	100	100
A ₁ **	55	65	70	70	70	70	70	70
A ₂ **	100	100	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO IX
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO 395

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	5	20	65	85	100
6 K	0	5	10	35	55	90	100	100
9 K	5	10	15	50	85	100	100	100
A ₁ **	30	55	70	60	65	65	65	75
A ₂ **	100	100	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO X
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO AS

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	0	10	30	60	90
6 K	0	0	5	15	50	100	100	100
9 K	0	5	10	30	85	100	100	100
A ₁ **	0	0	55	65	65	65	65	65
A ₂ **	0	85	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XI
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO 265

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	5	20	40	80	100	100	100
6 K	5	15	65	90	100	100	100	100
9 K	10	35	85	100	100	100	100	100
A ₁ **	0	5	65	60	65	65	65	70
A ₂ **	10	85	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XII
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO 18

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	0	0	0	10	35
6 K	10	5	0	0	0	15	40	90
9 K	15	10	10	5	15	30	65	90
A ₁ **	5	60	70	70	70	65	70	70
A ₂ **	85	100	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XIII
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO PTL

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	5	15	45	85	100
6 K	0	0	5	15	65	85	100	100
9 K	0	5	15	40	90	100	100	100
A ₁ **	5	45	65	65	65	70	70	60
A ₂ **	85	100	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XIV
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO SM

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	5	20	40	65	85	100	100	100
6 K	20	55	80	90	100	100	100	100
9 K	40	80	100	100	100	100	100	100
A ₁ **	0	50	65	65	65	65	65	70
A ₂ **	85	100	100	100	100	100	100	100

* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

** A₁ = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

** A₂ = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

NOTA: Na titulação dos antígenos de amostras separadas, os outros testemunhos incluídos revelaram os seguintes resultados.

Testemunhos do soro { 1 unidade = 35%
2 unidades = 85%

Testemunhos do complemento { 1 unidade = 65%
2 unidades = 100%

Testemunho do sistema hemolítico = 0%

As oito amostras de antígenos foram também experimentadas em reação de precipitação com sôro fortemente positivo para precipitinas. Os resultados estão no Quadro XV.

QUADRO XV

REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO COM 8 ANTÍGENOS DE AMOSTRAS DIFERENTES E SÔRO POSITIVO, NÃO DILUÍDO

<i>Amostras</i>	Diluições dos antígenos		
	1/5	1/15	1/45
395	++++	+++	+++
18	++	+++	+++
265	++++	++++	+++
A.S.	++++	++++	++++
S.N.	+++	++	+
S.M.	++	+++	+++
104	+++	+	+
P.T.L.	+++	++	+++

Verificamos pelo Quadro XV que tôdas as amostras liberaram polissacarídeos que funcionaram como antígeno nas reações de precipitação com sôro positivo.

REAÇÕES DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

No presente estudo, referimos resultados obtidos em reações de fixação do complemento, empregando duas técnicas, a de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER (1947) e a de STEIN & VAN NGU (1950). Em nossa tese de doutoramento (1955), estudamos a padronização do antígeno, para seu emprêgo em ambas as técnicas e referimos a modificação da técnica de STEIN & VAN NGU por nós utilizada. Concluimos, naquela ocasião, que o emprêgo simultâneo das duas técnicas era realmente interessante, porque, além de per-

mitir a comparação dos resultados para um mesmo soro, a técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER (1947) se revelou mais sensível, enquanto que a de STEIN & VAN NGU (1950) foi mais específica.

Em nosso trabalho anterior, explicamos a padronização dos elementos das reações de fixação do complemento e não voltaremos a fazê-lo aqui. Para facilitar ao leitor, descreveremos resumidamente os dados fundamentais referentes aos elementos da reação e às técnicas que utilizamos.

- A) *Hemácias de carneiro* — Suspensão a 5% padronizada em colorímetro fotoelétrico (Evans electroselenium) em densidade óptica igual a 0,54 ou 0,56, quando se lisa 0,1 ml da suspensão em 0,9 ml de água destilada. Foi usada sempre mistura de hemácias de dois carneiros.
- B) *Soro hemolítico* — Soro de coelho anti-hemácias de carneiro, padronizado de tal modo que a sensibilização das hemácias era ótima para a dose empregada.
- C) *Complemento* — Mistura de soros de 15-20 cobaios, titulado em unidades 50% de hemólise.
- D) *Solução fisiológica* tamponada com Veronal e contendo cálcio, magnésio e gelatina.
- E) *Antígeno* — Polissacarídeo obtido de várias amostras de *P. brasiliensis* e titulado de acordo com o que já foi exposto em nossa tese de doutoramento (1955).
- F) *Soros* — Colhidos e mantidos estérilmente a -25°C até o momento do uso, quando eram inativados a 56°C, 1/2 hora.

Segundo referimos em nossa tese de doutoramento (1955), os elementos da reação de fixação do complemento, com exceção do antígeno, foram padronizados do mesmo modo, para o emprego nas duas técnicas de que nos utilizamos.

Também os volumes dos reagentes e os períodos de incubação foram os mesmos e, pela ordem em que são distribuídos, são os seguintes:

Soro	0,05 ml
Antígeno	0,10 ml
Complemento	0,10 ml
Solução fisiológica	0,05 ml

Incubação a 2-4°C, durante 18 horas.

Sistema hemolítico 0,2 ml

Incubação em banho-maria a 37°C, durante 15 minutos.

Solução fisiológica gelada — 0,5 ml

Agitação. Centrifugação. Leitura da densidade óptica do sobrenadante em colorímetro.

Finalmente, queremos chamar a atenção para o fato de só termos feito o cálculo do título aproximado dos soros, pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e, ainda, para o fato de, por esta técnica, o título ser dado para 0,05 ml de sôro, enquanto que os títulos, pela técnica de STEIN & VAN NGU, representam o número de unidades de complemento (50% de hemólise) fixadas por 1 ml de sôro. Como trabalhamos com volume de 0,05 ml na execução da reação, os eventuais erros ficam multiplicados por 20 nos resultados.

REAÇÃO DE PRECIPITAÇÃO

Na padronização da reação de precipitação, baseamos-nos principalmente no trabalho de SMITH & colab. (1950). Apoiados na indiscutível experiência dêsses AA., é que passamos a executar a reação nos moldes em que será exposta.

Antígeno — Polissacarídeo obtido de várias amostras de *P. brasiliensis*, segundo técnica já publicada por FAVA NETTO (1955). Não experimentamos outros antígenos, pois, segundo SMITH & colab. (1950), a parte polissacarídica da coccidicidina funciona como bom antígeno em provas de precipitação e mesmo o polissacarídeo purificado de HASSID & colab. (1943) se comportou como bom antígeno. Também a experiência de NORDÉN (1951), com antígenos obtidos de *Sp. schencki*, demonstrava que os polissacarídeos funcionam bem em provas de precipitação. Seguindo NORDÉN (1951), fizemos tentativa para verificação da diluição ótima do antígeno, realizando provas cruzadas. Verificamos que o sôro, quando diluído, perde rapidamente a sua capacidade precipitante e que uma mesma diluição do sôro dá prova positiva com diluições numerosas do antígeno. A escolha de uma das diluições do antígeno seria, então, arbitrária. As diluições, que empregamos na realização da prova, foram baseadas na experiência de SMITH & colab. (1950). Sabe-

mos que as provas de precipitação, em sua aplicação clínica, são simplesmente qualitativas e, o que realmente importa, é usar várias diluições do antígeno, para evitar reações falsamente negativas por excesso de antígeno.

Soros — Separados estérilmente e usados, quase sempre, logo após a sua separação. Alguns foram conservados em geladeira por 1 ou 2 dias antes do uso e outros usados após terem sido congelados a -25°C . Evitamos sempre o seu congelamento, pois os soros de pacientes de blastomicose após serem congelados apresentam, às vezes, auto-precipitação, o que torna inexequível a prova. Antes do uso, os soros foram inativados a 56°C , durante 1/2 hora.

Solução fisiológica — Como diluente dos elementos, utilizamos solução de cloreto de sódio quimicamente puro a 0,85% e mertiolatada a 1/5.000.

Tubos de ensaio — Empregamos tubos de 10 x 75 mm ou 10 x 100 mm.

Técnica da reação — Para cada prova utilizávamos 5 tubos de ensaio. Todos recebiam 0,2 ml de soro não diluído. Os quatro primeiros recebiam a seguir, 0,2 ml das diluições do antígeno, a 1/5, 1/15, 1/45 e 1/135. O último tubo recebia 0,2 ml da solução fisiológica mertiolatada. O 5.º tubo servia, portanto, como testemunho do soro. Em cada dia de execução da prova, incluíamos série de 4 tubos, que recebiam, respectivamente, 0,2 ml das diluições do antígeno e 0,2 ml de solução fisiológica mertiolatada. Eram os testemunhos das diluições do antígeno.

A seguir, os tubos eram agitados e colocados em estufa a 37°C , durante 2 horas. Agitados novamente e colocados em geladeira ($2-4^{\circ}\text{C}$), durante 48 horas. A leitura se fez pela verificação de depósito precipitado no fundo do tubo e também com leves batidas no fundo do tubo para suspender o precipitado. A leitura deve ser feita contra a luz da janela e com fundo escuro. Os testemunhos do antígeno e do soro não devem apresentar qualquer precipitado.

Quando iniciamos a realização das reações de precipitação, utilizávamos além do soro puro, uma série de tubos com soro diluído a 1/2. A inclusão dessa série, no entanto, não apresentava interesse prático e a abandonamos. Também tentamos fazer a verifi-

cação do aparecimento de anel de precipitação pela superposição cuidadosa de 0,2 ml de antígeno, nas suas várias diluições, sobre 0,2 ml de sêro não diluído. O anel de precipitação se formava somente em alguns soros e não apresentava correspondência com o precipitado que se verificava após 48 horas de geladeira. Esse processo de leitura também foi abandonado. Finalmente queremos ressaltar que o critério para referir grau de intensidade da reação em cada tubo foi puramente individual, motivo pelo qual tivemos de ler pessoalmente tôdas as reações realizadas. Frequentemente nos defrontamos com soros que revelaram quantidade de precipitado muito maior daquele que convenciamos referir como 4 cruces e que assim foram anotados, por ser a reação máxima que resolvemos conferir.

Com as diluições de antígenos por nós utilizadas, raramente notamos fenômenos de zona, isto é, inibição da reação por excesso de antígeno.

Não empregamos antígeno não diluído, como fizeram SMITH & colab. (1950), porque notamos em várias tentativas que, no testemunho do antígeno não diluído, formava-se pequeno depósito pulverulento e pretendíamos referir, como o fizemos, reações fracas de 1 a 2 cruces de precipitação.

RESULTADOS

Do início de nossos estudos em 1953, a março de 1959, observamos, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 314 pacientes de blastomicose sul-americana. Até novembro de 1955 realizamos somente reações de fixação do complemento; 83 casos foram estudados só por êste método e não serão aqui referidos. Objeto dêste capítulo são os resultados obtidos pela realização simultânea das reações de fixação do complemento e de precipitação em 220 casos de blastomicose sul-americana, bem como as observações feitas em 11 casos especiais, que serão referidos separadamente e ainda estudos imunológicos realizados em familiares de pacientes de blastomicose.

Já assinalamos em nossa tese de doutoramento que o estudo imunológico dos pacientes de blastomicose sul-americana é de primordial interêsse para o seguimento dos pacientes, na verificação da queda do teor de anticorpos no sêro e mesmo na verificação da cura sorológica, ao lado da cura clínica. É natural, portanto, que tenhamos resultados de exames de numerosas amostras de sêro de

um mesmo paciente. Julgamos desnecessário apresentar, neste trabalho, os resultados obtidos em todos os soros por nós examinados. As conclusões que o estudo evolutivo permite poderão ser obtidas da apresentação de grupos selecionados de casos representativos. Esta exposição será feita, no entanto, após a análise dos resultados verificados nos 220 pacientes em conjunto.

Para cada paciente que observamos, fizemos ficha da qual constam, além dos dados de identificação, o tempo de duração da moléstia ao se obter o primeiro sôro para exames (pelas reações de fixação do complemento de precipitação) e a observação clínica (por anamnese, exame físico e exames subsidiários) dos tipos de lesões apresentadas. É muito importante salientar que há heterogeneidade acentuada nas observações, pois que a maioria dos pacientes, sendo do Hospital das Clínicas, possui dados mais seguros no que diz respeito à extensão das lesões, enquanto que, em outros pacientes, os dados foram obtidos pela anamnese e exame físico sumário em observação ambulatoria no Departamento de Microbiologia e Imunologia e em outros Serviços.

Na análise conjunta dos resultados, no entanto, baseamos-nos nas informações de ordem clínica para assim pormos à prova os dados imunológicos por nós obtidos.

Baseando-nos nas informações de ordem clínica, conseguimos separar os pacientes em 3 grupos distintos, tomando como referência a condição por eles apresentada quando examinamos os seus soros, pelas provas de fixação do complemento e de precipitação, pela primeira vez.

Grupo A — Pacientes com lesões localizadas, sem repercussão ganglionar evidente. Incluimos aqui, também, alguns casos raros de lesões localizadas, como abscesso da região íleo-psoas que, apesar de serem metastáticas, comportaram-se como lesões únicas, sem evidência de outras localizações no mesmo paciente.

Grupo B — Pacientes classificados como de forma disseminada da moléstia, por apresentarem mais que um tipo de lesão (mucosa da bôca e pulmão; mucosa e ganglionar; cutânea e ganglionar) ou formas declaradamente generalizadas.

Grupo C — Pacientes que, quando foram submetidos ao primeiro exame sorológico, já se apresentavam clinicamente curados.

Para análise dos resultados imunológicos obtidos no estudo dos 3 grupos de pacientes, organizamos os Quadros XVI a XX, onde a 1.^a coluna refere a duração da moléstia antes do primeiro exame e as colunas seguintes, pela ordem, o número de casos em cada grupo; o número de reações de precipitação positivas; o número de reações de fixação do complemento positivas; o título mínimo de anticorpos fixadores do complemento, obtido dentro do grupo, pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER; o título máximo em anticorpos fixadores do complemento pela mesma técnica e finalmente, na última coluna, a média dos títulos obtida pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER. Podemos verificar que, para cada grupo, existem dois quadros separados, de acôrdo com a duração da moléstia até 11 meses e 1 ano ou mais. Faz exceção o grupo C, em que os pacientes, quando observados pela primeira vez, já apresentavam a moléstia há mais de 11 meses. Na última linha temos os totais de cada quadro: na 2.^a coluna o total de casos, em seguida o total de reações de precipitação positivas e a percentagem de positividade dentro do grupo; depois, o total de reações de fixação do complemento positivas e a respectiva percentagem de positividade. Finalmente, na última subdivisão de cada quadro, apresentamos o cálculo da média geral, para o grupo, do teor de anticorpos (título médio geral).

Os Quadros XVI e XVII apresentam os resultados obtidos em 22 pacientes que foram classificados clinicamente como formas localizadas da moléstia. Verificamos que, nos pacientes cuja moléstia apresentava evolução de menos de 1 ano, obtivemos 100% de resultados positivos pela reação de precipitação e somente 66,6% de resultados positivos pela reação de fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER. Nos pacientes cuja duração da moléstia era de 1 ano ou mais, obtivemos 40% de positividade na reação de precipitação e a positividade da reação de fixação do complemento aumentou para 80%. O título médio geral de anticorpos fixadores do complemento nestes grupos é bem maior para aqueles pacientes cuja moléstia apresentava duração de menos de 1 ano.

QUADRO XVI
FORMAS LOCALIZADAS

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 mês	1	1	1	26	26	26
4 meses	1	1	—	—	—	—
6 meses	2	2	1	—	50	25
8 meses	2	2	2	3,6	14	9
9 meses	4	4	3	2	18	7
10 meses	2	2	1	—	51	25
Total	12	12 (100%)	8 (66,6%)			Título médio geral 14,6

QUADRO XVII
FORMAS LOCALIZADAS

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 ano	3	2	3	9,5	13	11
2 anos	2	—	2	5,2	7	6
4 anos	2	—	1	—	2	1
5 anos	1	1	—	—	—	—
6 anos	1	1	1	6	6	6
10 anos	1	—	1	2,5	2,5	2,5
Total	10	4 (40%)	8 (80%)			Título médio geral 5,8

Os Quadros XVIII e XIX mostram os resultados obtidos em pacientes que apresentavam forma disseminada da moléstia. Podemos verificar que não há diferenças acentuadas entre as porcentagens de positividade nas reações de precipitação e de fixação do complemento, nos pacientes com duração da moléstia de menos de 1 ano e 1 ano ou mais. O mesmo acontece no que diz respeito ao título médio geral obtido nestes dois grupos. Chama a atenção nestes quadros a alta positividade da reação de fixação do complemento (acima de 95%).

QUADRO XVIII

FORMAS DISSEMINADAS

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 mês	3	3	3	16	115	63
2 meses	7	6	7	2,1	145	67
3 meses	6	3	5	—	128	51
4 meses	1	1	1	116	116	116
5 meses	4	3	3	—	80	28
6 meses	17	11	16	—	92	25
7 meses	7	6	7	9	186	55
8 meses	9	8	9	2	109	48
10 meses	4	4	4	9,5	63	27
11 meses	1	1	1	47	47	47
Total	59	46 (78%)	56 (95%)			Título médio geral 44,2

QUADRO XIX
FORMAS DISSEMINADAS

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 ano	31	19	28	—	335	36
2 anos	19	15	18	—	190	44
3 anos	14	12	14	2	211	51
4 anos	6	4	6	2,9	37	20
5 anos	11	10	11	4,7	320	63
6 anos	4	3	4	10	130	44
7 anos	6	4	6	3,5	44	24
8 anos	6	6	6	11	177	60
9 anos	1	—	1	13	13	13
> 10 anos	9	7	9	5	129	31
Total	107	80 (74,8%)	103 (96,3%)			Título médio geral 41,1

O Quadro XX refere os resultados obtidos em pacientes considerados clinicamente curados, no momento do exame.

Devemos assinalar que muitos dos pacientes incluídos em qualquer um dos quadros apresentados estavam em tratamento, mas só foram incluídos nos 2 primeiros grupos aquêles pacientes considerados não curados, enquanto que, no último grupo, só foram incluídos pacientes clinicamente curados.

Devemos assinalar ainda que, nos 220 casos por nós analisados, somente em 8 obtivemos resultados negativos pelas reações de fixação do complemento e de precipitação ao primeiro exame. A sensibilidade dada pela associação das duas reações seria de 96,37%.

QUADRO XX
CASOS CLINICAMENTE CURADOS

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 ano	6	3	5	—	11	4,5
2 anos	3	—	3	4,5	8	6
3 anos	6	2	6	2,8	10	6
4 anos	1	1	1	3,5	3,5	3,5
5 anos	2	—	1	2,8	2,8	2,8
6 anos	5	2	3	—	4,2	3,4
7 anos	2	1	2	2,7	5	3,8
8 anos	3	—	2	5,5	6,5	6
11 anos	1	—	1	3,4	3,4	3,4
12 anos	2	1	1	2	2	2
13 anos	1	—	—	—	—	—
Total	32	10 (31,3%)	25 (78,1%)			Título médio geral 3,9

Acontece porém que êstes 8 casos negativos se encontravam assim distribuídos pelos grupos que estabelecemos: 1 entre as formas localizadas, 2 entre as formas disseminadas e 5 entre as formas clinicamente curadas. Analisando, então, a sensibilidade das provas, excluindo as formas clinicamente curadas (32 casos), teremos a incidência de 3 resultados negativos em 188 casos, o que dá uma sensibilidade de 98,4%.

Voltamos a recordar que esta sensibilidade, revelada pela associação das duas provas, refere-se ao primeiro exame efetuado no sôro de cada paciente. É fácil supor que se os exames se repetirem, a sensibilidade aumentará.

QUADRO XXI
ESTUDO EVOLUTIVO DAS FORMAS LOCALIZADAS

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
A.A.	1 mês	9/ 5/56	26,0	468	++++	++++	++++	-	Quando visto pela primeira vez, apresentava somente lesão da gengiva. Não apresentava adenopatia nem lesão pulmonar ao exame radiológico. Em 30/7/56, a lesão mucosa já havia cicatrizado. Continuou sempre sob tratamento e sem apresentar recaídas clínicas da moléstia. Em 17/4/59, radiografia dos pulmões revela ter havido comprometimento dessa viscera.
		30/ 7/56	39,0	735	++++	++	+++	++	
		1/10/56	31,0	320	++	+	-	-	
		3/12/56	14,0	195	++++	++++	++	-	
		4/ 2/57	12,0	219	-	-	-	-	
		21/ 6/57	4,0	97	-	-	-	-	
		27/ 8/57	32,0	380	-	-	-	-	
		20/12/57	6,2	90	-	-	-	-	
		25/ 2/58	3,4	80	+	+	-	-	
		31/ 3/58	5,4	101	++	-	-	-	
		19/ 6/58	6,2	54	-	-	-	-	
		15/ 9/58	4,5	80	++++	++	+	-	
		16/12/58	23,0	640	++	-	-	-	
		16/ 4/59	2,4	-	+++	+	-	-	
		31/ 6/59	3,5	49	+	-	-	-	
21/ 7/59	3,6	40	++	++	+	-			
L.M.	4 meses	5/ 5/58	-	25	++++	+++	+	-	Apresentava somente lesões da mucosa oral.
P. N.	6 meses	6/ 4/56	-	-	++++	++	+	-	Verificadas somente lesões do lábio inferior.

(Continua)

QUADRO XXI (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.F.	8 meses	30/ 8/58 27/10/58	3,6 27,0	66 320	+ ++	- -	- -	- -	Lesão mucosa do palato. Em 27/10/58, apesar do tratamento, havia piorado da lesão.
J.M.	9 meses	15/ 3/56 18/ 8/56 11/ 3/57 11/ 5/59	9,0 13,0 3,5 -	493 139 47 -	++ ++ - -	+ ++ - -	- + - -	- + - -	Lesão mucosa da gengiva e assoalho da boca. Em 11/5/59, há 2 anos sem tratamento e clinicamente curado.
C.C.	10 meses	26/11/56 28/ 2/57 18/ 9/57 20/12/57	- 2,0 2,7 2,3	- 160 85 -	++++ +++ +++ ++++	++++ + ++ +	++++ - - -	+++ - - -	Verificadas lesões mucosas da boca. Não apresentava adenoptia. Queixava-se de tosse e escarro. Em tratamento.
A.C.V.	1 ano	26/ 6/56 23/ 8/56 25/10/56 11/ 1/57 22/ 8/57	9,5 7,0 2,0 - -	349 95 - - -	+++ ++ - - ++	+++ + - - +	++ + - - -	- + - - -	Lesão do palato mole. Não havia adenopatia. Queixava-se de tosse e escarro. Em 23/8/56, a lesão mucosa já havia cicatrizado. Continuava em tratamento, quando visto pela última vez.

(Continua)

QUADRO XXI (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
A.B.F.	1 ano	22/ 7/57	13,0	61	+	+	-	-	Lesões da língua estendendo-se para epiglote e laringe. Não apresentou lesão pulmonar. Em 17/9/57, estava clinicamente curado. Continuou em tratamento até 21/11/58.
		17/ 9/57	29,0	91	-	-	-	-	
		25/11/57	6,8	160	-	-	-	-	
		23/ 1/58	6,5	160	++	+	+	-	
		17/ 3/58	11,0	117	-	-	-	-	
		20/ 5/58	4,2	113	-	-	-	-	
		23/ 7/58	2,8	50	-	-	-	-	
		18/ 9/58	2,0	48	-	-	-	-	
		21/11/58	3,0	20	-	-	-	-	
		25/ 2/59	3,1	-	-	-	-	-	
		23/ 5/59	4,0	-	-	-	-	-	
19/ 8/59	-	-	-	-	-	-			

(Continua)

QUADRO XXI (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
F.S.	2 ½ anos	7/11/55	7,0	195	—	—	—	—	Quando visto pela primeira vez, apresentava granuloma hipertrófico difuso do lábio. Era recaída de blastomicose mucosa, após haver abandonado o tratamento por 1 ano. Em 23/1/56, estava clinicamente curado. Em 19/7/58, há 23 meses sem tratamento, e clinicamente curado.
		23/ 1/56	4,5	127	+	—	—	—	
		3/ 4/56	7,0	260	—	—	—	—	
		6/ 6/56	6,0	48	+	—	—	—	
		17/ 8/56	7,5	109	—	—	—	—	
		15/10/56	3,0	62	—	—	—	—	
		14/12/56	3,0	112	—	—	—	—	
		19/ 3/57	2,5	—	++	+	—	—	
		18/10/57	—	—	—	—	—	—	
19/ 7/58	—	—	—	—	—	—			
V.T.	6 anos	18/12/56	6,0	100	++++	++++	+	—	Diagnóstico por biopsia da faringe. Não apresentava adenopatia nem lesão pulmonar.

QUADRO XXII

ESTUDO EVOLUTIVO DAS FORMAS DISSEMINADAS

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.Z.	1 ½ mês	13/ 4/57	69	2.228	++	+	-	-	Lesão mucosa na epiglote. Extensas lesões pulmonares. Em 13/8/57, lesões mucosas cicatrizadas. Continuou sempre em tratamento até 14/7/59. Clinicamente curado e passando bem.
		13/ 8/57	29	320	+	-	-	-	
		14/10/57	31	320	-	-	-	-	
		21/11/57	21	640	++	+	-	-	
		13/ 1/58	18	698	++	-	-	-	
		17/ 3/58	17	823	-	-	-	-	
		12/ 5/58	24	475	++++	+++	++	+	
		14/ 7/58	15	468	+++	++	+	-	
		15/ 9/58	24	830	+	-	-	-	
		4/11/58	26	640	++	-	-	-	
		12/ 1/59	19	1.470	-	-	-	-	
		12/ 3/59	15	435	-	-	-	-	
		11/ 5/59	10	160	++	+	-	-	
14/ 7/59	15	508	-	-	-	-			

(Continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
C.R.	2 meses	5/11/56	132	5.120	+++	++	-	-	Adenopatia cervical. Lesões granulomatosas não ulceradas no rosto. Em 5/1/57, já havia cicatrização completa das fistulas dos gânglios cervicais com diminuição acentuada do tamanho dos mesmos. Continuava em tratamento em 7/8/59. Clinicamente curada.
		10/ 1/57	116	3.507					
		25/ 2/57	11	1.413	-	-	-	-	
		8/ 7/57	7,5	63	-	-	-	-	
		27/ 8/57	3,0	20	-	-	-	-	
		28/ 8/58	4,0	160	+	-	-	-	
		29/ 4/59	-	139	++++	++++	+++	+	
		7/ 8/59	2,2	-	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
B.B.P.	3 meses	17/ 8/56	92	735	++	+	-	-	Lesão da faringe, do palato e pulmonar. Em 30/3/57, as lesões mucosas estavam completamente cicatrizadas. Em 10/8/59 mantinha-se clinicamente curado mas em tratamento, sendo que o mesmo foi interrompido várias vezes durante o período de observação.
		23/10/56	11	640	++	+	-	-	
		18/12/56	16	320	++++	+	-	-	
		28/ 2/57	9,5	254	-	-	-	-	
		30/ 3/57	2	160	-	-	-	-	
		16/ 8/57	11	97	-	-	-	-	
		23/11/57	6,7	92	-	-	-	-	
		5/ 5/58	6	88	-	-	-	-	
		11/ 7/58	2,9	-	-	-	-	-	
		15/12/58	4,5	101	-	-	-	-	
		23/ 3/59	-	28	++	-	-	-	
		17/ 4/59	-	-	-	-	-	-	
		11/ 8/59	2,3	40	+	-	-	-	
G.P.V.	6 meses	17/ 1/57	30	507	++++	++++	++	-	Blastomicose pulmonar grave mais caquexia. Até 13/3/58 tratamento irregular. Radiografia revela lesões pulmonares em atividade.
		22/ 2/57	12	1.613	++++	+++	++	-	
		13/ 3/58	7	698	++++	++++	++++	++	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.T.L.	8 meses	25/10/55	35	1.809	++++	++++	+++	+	Forma ganglionar, quando visto pela primeira vez. Em 20/9/56, forma cutânea e ganglionar generalizada. Resistência à sulfa. Melhora pela associação com Vitamina D ₂ , até 12/4/58 Em seguida, quadro de septicemia blastomicótica. Tratamento com Anfotericina B e cura clínica. Em 1959, novo tratamento com Anfotericina B baseado na evolução sorológica.
		20/ 9/56	258	6.450	++++	++++	+++	+	
		5/ 7/57	609	25.063	++++	++++	++++	++	
		19/ 8/57	865	20.480	++++	++++	+++	++	
		4/ 2/58	185	6.450	++++	++++	++++	++++	
		31/ 3/58	138	1.722	+++	++	+	-	
		12/ 4/58	96	3.978	+++	++	+	-	
		4/ 6/58	203	14.479	++++	++++	+++	++	
		24/ 6/58	62	1.896	++++	++	++	-	
		24/ 7/58	14	422	+++	+	-	-	
		4/ 9/58	17	254	+	+	-	-	
		1/10/58	14	1.050	-	-	-	-	
		22/12/58	8	368	++	-	-	-	
		21/ 5/59	19	640	+	-	-	-	
		2/ 7/59	3	341	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
H.V.	1 ano	8/ 3/57	31	538	++++	++++	++	+	Lesões laringeanas e pulmonares. Em 1/4/59, clinicamente curado em tratamento.
		2/ 5/57	18	184	++++	++++	++	+	
		4/ 7/57	6,5		++++	++++	+++	++	
		6/ 9/57	8	144	-	++	+	-	
		27/ 2/58	3,1	181	++	++	-	-	
		1/ 4/59	2,9	40	++	+	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
D.F.V.	1 ½ ano	20/11/55	21	1.114	++++	++++	++++	+++	Lesões da boca, laringe e pulmões. Em 19/4/56, melhora do quadro pulmonar, lesão mucosa ainda com sinais de inflamação. Em 14/9/56, recaída das lesões mucosas apesar do tratamento. Em 1958, foi internado para observação e sua evolução foi considerada boa. Sempre em tratamento durante o período de observação.
		6/12/55	29	870	++++	++++	++	+	
		4/ 2/56	9	1.050	+++	++	+	-	
		19/ 4/56	20	517	+++	+	-	-	
		14/ 9/56	31	438	+	-	-	-	
		3/11/56	10	320	-	-	-	-	
		17/ 1/57	13	480	-	-	-	-	
		6/ 2/57	15	845	-	-	-	-	
		30/ 3/57	5,5	190	++++	+++	++	+	
		8/ 6/57	16	452	-	-	-	-	
		18/ 7/57	7	254	-	-	-	-	
		25/11/58	6,5	106	-	-	-	-	
		17/ 2/59	5	63	-	-	-	-	
		13/ 5/59	5,5	80	+	-	-	-	
		26/ 5/59	7,4	180	-	-	-	-	
		14/ 7/59	7	121	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.R.S.	2 anos e 3 meses	18/ 4/58	39	805	++++	++	+	-	Lesões da gengiva e ganglionares generalizadas. Recaída quando visto pela primeira vez, com resistência à sulfa. Tratado com Anfotericina B, teve recaída e foi novamente tratado.
		29/ 4/58	14	422	++	+	+	-	
		31/ 5/58	14	160					
		5/ 9/58	22	640	-	-	-	-	
		21/10/58	18	215	-	-	-	-	
		9/ 1/59	5,7	160	-	-	-	-	
		6/ 3/59	7,6	160	-	-	-	-	
		7/ 7/59	4,4	160	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.C.	3 ½ anos	23/11/56	40	1.049	++++	+++	++	+	Lesões mucosas, ganglionares e pulmonares. Em 23/11/56 havia abandonado o tratamento há 1 ano, após cura clínica. Referia anorexia e dores abdominais indefinidas. Reiniciou o tratamento e passou relativamente bem durante todo o período de observação. Não abandonou o tratamento.
		26/ 1/57	46	772	++	—	—	—	
		16/ 3/57	17	320	++	++	+	—	
		21/ 5/57	14	177	++	+	—	—	
		2/ 7/57	137	24.350	+++	++	+	—	
		10/ 9/57	230	7.240	++++	++	+	—	
		20/11/57	35	570	++++	+++	++	—	
		14/ 1/58	21	490	++	—	—	—	
		8/ 4/58	27	592	++++	++++	+++	++	
		12/ 8/58	21	422	—	—	—	—	
		16/ 9/58	21	190	++	+	—	—	
		14/10/58	10	490	++	—	—	—	
		9/12/58	39	2.560	—	—	—	—	
		31/ 1/59	8,7	127	—	—	—	—	
		23/ 3/59	6,5	173	++	+	—	—	
6/ 6/59	27	254	+	+	+	—			

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.C.	4 anos	20/ 1/56	56	8.120	++++	+++	++	+	Lesões mucosas, cutâneas e ganglionares. Não se curou completamente. Fases de melhora e de recaída com tratamento sulfamidico. No 2.º semestre de 1958, tratamento com Anfotericina B, cura clínica. Em 26/6/59, voltou apresentando recaída ganglionar. Tratamento com sulfa de eliminação prolongada.
		17/ 9/56	215	5.120	++++	+	-	-	
		26/11/56	39	1.522	++++	++++	+++	+	
		13/ 4/57	100	2.560	++++	++++	+	-	
		18/ 6/57	31	2.560	++++	++++	++	++	
		18/10/57	36	3.620	++++	+++	++	+	
		8/ 8/58	46	1.280	++++	++++	++++	++	
		5/11/58	13	557	++++	+++	+	-	
		21/11/58	14	320	++++	++++	+++	+	
		22/12/58	13	845	++++	++	+	-	
		26/ 6/59	85	2.257	++++	++++	++++	++	
		24/ 9/59	15	1.522	++++	++++	++++	++++	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
T.R.	4 anos	28/11/55	22	780	++++	++	++	+	Lesões pulmonares e mucosas. Cura clínica por tratamento sulfamídico. As lesões pulmonares continuaram em atividade, sendo que, em 1/7/57, foi verificada escavação. Em 21/10/58, após passar 2 meses sem tratamento, houve recaída de lesão mucosa. Em 19/8/59, clinicamente curado. Exame radiológico apresentando quadro de fibrose pulmonar estacionária.
		7/ 2/56	9	254	++	-	-	-	
		3/ 5/56	22	148	-	-	-	-	
		17/ 7/56	15	188	-	-	-	-	
		20/ 8/56	42	139	+++	++	++	++	
		18/10/56	5,3	160	++	+	-	-	
		10/ 1/57	6	80	-	-	-	-	
		8/ 3/57	3,5	40	-	-	-	-	
		1/ 7/57	3,5	50	-	-	-	-	
		23/ 9/57	5,8	-	-	-	-	-	
		25/ 2/58	2,1	61	-	-	-	-	
		12/ 5/58	2,6	-	-	-	-	-	
		22/ 7/58	2,8	24	-	-	-	-	
		21/10/58	2,9	57	-	-	-	-	
		27/ 2/59	3,1	40	-	-	-	-	
		20/ 8/59	2,2	-	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
Z.J.D.	5 anos	7/11/55	6,5	422	++++	++++	++	+	Lesões tegumentares, linfáticas e pulmonares. Sempre em tratamento irregular com recaídas. Em fins de 1958, foi tratado com Anfotericina B.
		13/ 1/56	10	720	++++	+++	+++	+	
		31/10/56	14	411	+++	+++	++	+	
		4/ 1/57	68	1.522	++	+	-	-	
		22/ 2/57	58	806	+++	++	-	-	
		21/11/58	38	320	++++	+++	++	+	
		23/ 3/59	2	40	++	++	+	+	
S.S.	8 anos	31/10/58	177	6.758	++++	++++	+++	+	Forma generalizada. Caquexia. Tratamento com Anfotericina B. Cura clínica. Terminou o tratamento em 24/12/58. Continuou clinicamente curado, sem tratamento.
		2/12/58	24	905	++++	++++	++	+	
		22/12/58	16	452	+	-	+	-	
		16/ 1/59	11	415	++	+	+	-	
		6/ 3/59	12	640	++++	++++	++++	++++	
		3/ 4/59	3,2	403	+	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
R.R.N.	9 anos	2/ 4/58	7,8	211	++++	+++	++++	+	Lesões tegumentares, ganglionares e pulmonares. Tratado com Anfotericina B. Recaida mucosa. Novo tratamento. Cura clínica mantida até 16/1/59.
		12/ 4/58	9,9	190	+	+	+	-	
		29/ 4/58	14	211	++	-	-	-	
		6/ 5/58	6,2	80	++++	++++	++	+	
		31/ 5/58	11	320	-	++++	++++	+++	
		2/ 7/58	2,3	89	++	+++	++	+	
		23/ 7/58	2,6	80	+	+++	++	++	
		11/ 8/58	2,1	-	-	-	-	-	
		13/ 9/58	-	-	++++	++++	+++	+	
		16/10/58	-	-	+++	++++	++	-	
16/ 1/59	-	-	-	++	++	++	+		

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.R.	15 anos	4/11/55	9,5	380	++++	++++	++	+	Forma generalizada. Numerosas recaídas. Tratado com Anfotericina B, a partir de 2/4/58. Alta, clinicamente curado, em 20/8/58. Em 2/10/58, recaída com lesão cutânea na orelha E. Novo tratamento com Anfotericina B. Alta clinicamente curado.
		8/ 7/57	9	293	+	+	-	-	
		2/ 4/58	12	254	+++	-	-	-	
		12/ 4/58	9	211	+	+	-	-	
		29/ 4/58	9	184	+++	++	+	-	
		31/ 5/58	11	170	++	++	++	-	
		27/ 6/58	6,5	97	-	-	-	-	
		20/ 8/58	9,5	101	-	-	-	-	
		2/10/58	8	452	++	++	+	-	
		5/12/58	5	80	++	-	-	-	
		9/ 1/59	3,7	180	++	+	+	-	
		30/ 1/59	7,5	160	+	+	-	-	
		16/ 2/59	5,4	160	+	+	-	-	
		19/ 6/59	8	160	+++	++	+	-	

QUADRO XXIII

ESTUDO EVOLUTIVO DAS FORMAS CLÍNICAMENTE CURADAS

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
S.C.	3 anos	6/12/55	3,6	80	++	+	-	-	Lesões mucosas e pulmonares. Cura clínica das lesões mucosas após 20 dias de tratamento. Lesões pulmonares — ótima evolução. Durante o período de observação, manteve-se clinicamente curado e em tratamento, sendo que fazia pequenas interrupções. Em 17/2/59, há 5 meses sem tratamento e clinicamente curado.
		11/ 2/56	2	43	-	-	-	-	
		12/ 4/56	3	80	+	-	-	-	
		16/ 6/56	2,7	47	++++	++	+	-	
		2/10/56	2	25	+	+	-	-	
		19/11/56	2,2	40	-	-	-	-	
		12/ 1/57	2,4	47	-	-	-	-	
		15/ 3/57	-	20	-	-	-	-	
		11/ 7/57	-	-	+	-	-	-	
		25/ 9/57	2	-	+	+	-	-	
		12/12/57	-	-	+	-	-	-	
		7/ 3/58	-	-	-	-	-	-	
		1/ 8/58	3,2	20	-	-	-	-	
		17/ 2/59	2,3	-	-	-	-	-	
A.C.	3 anos	6/ 9/56	6,5	27	+++	++	++	+	Blastomicose da mucosa bucal e pulmonar. Quando visto pela 1. ^a vez, há 2 anos, sem tratamento e clinicamente curado.
		10/ 5/57	5	50	+	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXIII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
A.A.L.	4 anos	20/ 9/56	3,5	35	++	+	-	-	Forma ganglionar. Fêz tratamento durante 4 meses. Há 4 anos sem tratamento, mantendo-se clinicamente curado.
F.G.	7 anos	15/ 1/57 8/ 3/58	- -	- -	- -	- -	- -	- -	Lesões mucosas, ganglionares e pulmonares. Em 14/1/57, há 26 meses sem sulfa e clinicamente curado.
J.P.N.	7 anos	9/11/55 13/ 9/56 3/12/56 22/ 3/57 24/ 6/57 26/ 9/57 18/ 8/58 8/ 1/59	2,7 2,5 2,1 - - - 3 2,2	160 32 46 20 - 538 40 160	++++ - +++ ++ + ++ - -	++++ - +++ + - ++ - -	+++ - + - - + - -	++ - - - - - - -	Lesões pulmonares, mucosas e ganglionares. Durante o período de observação, manteve-se clinicamente curado. Aspecto radiológico de fibrose pulmonar e tumoração mediastínica. Em tratamento.

(continua)

QUADRO XXIII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.B.	8 anos	2/ 6/56	6,5	171	—	—	—	—	Lesões mucosas e pulmonares. Quando visto pela primeira vez, estava clinicamente curado e assim se manteve durante o período de observação. Quadro radiológico pulmonar revelando lesões fibrosas. Em tratamento até março de 1957.
		2/ 9/56	13	160	—	—	—	—	
		20/10/56	4,2	243	+	++	—	—	
		30/10/56	7,5	145	—	—	—	—	
		14/12/56	5	104	—	—	—	—	
		8/ 3/57	3,5	97	—	—	—	—	
		24/ 7/57	—	—	—	—	—	—	
		8/ 1/58	2,9	40	—	—	—	—	
		24/10/58	3,2	80	—	—	—	—	
		M.P.	13 anos	29/ 9/56	—	—	—	—	

Passemos agora a referir os resultados obtidos no estudo evolutivo dos pacientes pertencentes aos vários grupos.

O Quadro XXI registra os resultados verificados numa série de casos classificados inicialmente como formas localizadas da moléstia. Neste quadro, constam na primeira coluna, as iniciais do paciente; na segunda, a duração da moléstia antes da primeira amostra de sôro, em seguida, as datas de colheita dos soros; o resultado das reações de fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER; o resultado da reação de fixação do complemento pela técnica de STEIN & VAN NGU; o resultado da reação de precipitação com as quatro diluições de antígeno e, finalmente, as observações mais importantes sôbre o caso.

Procuramos incluir, neste quadro, casos com vários períodos de evolução da moléstia antes do início de nossa observação. Verificamos a inclusão, neste grupo, de caso classificado inicialmente como forma localizada da moléstia (paciente A.A.) que, contudo, era de forma disseminada, como poderíamos verificar de início, se contássemos com todos os dados de ordem clínica. Submetido a exame radiológico, após conhecimento do comportamento sorológico, revelou lesões pulmonares residuais, indicando comprometimento também dessa víscera, ao lado das lesões mucosas, que o paciente apresentava.

O Quadro XXII, organizado do mesmo modo que o quadro anterior, apresenta os resultados obtidos nas formas disseminadas da moléstia. São apresentados 15 casos, onde podemos verificar os vários tipos de evolução da forma disseminada da blastomicose sul-americana. Neste grupo de pacientes verificamos, como regra geral, a presença de altos níveis de anticorpos fixadores do complemento e a positividade da reação de precipitação, quando a moléstia se encontra em atividade. Verifica-se ainda que, nesta forma de blastomicose, não há influência da duração da moléstia sôbre a positividade da reação de precipitação, sendo que as precipitinas se encontravam presentes em paciente cuja moléstia existia há 15 anos.

Finalmente, no Quadro XXIII, também com a mesma organização, expomos os resultados obtidos em 7 casos clinicamente curados. Verificamos, neste quadro, casos clínica e sorologicamente curados (F.G. e M.P.). Nos outros, baixo teor em anticorpos fixadores do complemento, com a reação de precipitação ainda positiva em alguns soros.

Passemos aos resultados obtidos em 11 casos de blastomicose sul-americana, que apresentaram aspectos especiais. O caso F. E., 13 anos, masculino, côr preta, era portador de blastomicose sul-americana e lepra tuberculóide. Os soros obtidos neste caso revelaram sempre alto nível de anticorpos fixadores do complemento. Foram examinadas quatro amostras de sôro durante os meses de outubro e novembro de 1954, com os seguintes resultados respectivamente pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e de STEIN & VAN NGU — títulos de 78, 59, 63, 45 e 2.318, 2.560, 2.118 e 2.348.

Dois casos apresentavam associação com tuberculose pulmonar. Um dêles — A. P., 45 anos, masculino, branco, com lesões ulcerosas da gengiva e extensas lesões pulmonares aos Rx. Exame direto positivo para *Paracoccidioides brasiliensis*, em material de lesão da gengiva e no escarro. Exame bacterioscópico e cultura do escarro positivos para B. K. Examinamos dois soros dêsse paciente; 1, em 26/12/56, revelou títulos em fixação do complemento de 2 e 100, respectivamente pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e STEIN & VAN NGU e reação de precipitação fortemente positiva; outro sôro, em 22/2/57, em que tanto as reações de fixação do complemento como de precipitação foram negativas.

Outro caso — J. M., 51 anos, masculino, branco, com lesão de laringe (biopsia e exame de escarro positivos para *Paracoccidioides brasiliensis*). Tratado com Sulfas e Iodeto de potássio, piorou bastante, sendo que, após 9 dias, o exame de escarro foi positivo para bacilos álcool-ácido-resistentes e a radiografia dos pulmões revelava lesão de ápice. Um exame sorológico para blastomicose demonstrou título de 2,2 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER (na fixação do complemento), reação negativa pela técnica de STEIN & VAN NGU e precipitinas negativas.

Um caso internado no Hospital das Clínicas, com diagnóstico de mal de Addison — F. P., 33 anos, masculino, branco, há 5 anos apresentava lesões nasais e da bôca com enfartamento ganglionar satélite, sendo que tôdas as manifestações regrediram rapidamente pelo tratamento sulfamídico. Apresentou, depois, várias recaídas. Quando se iniciou nossa observação, apresentava somente sinais de insuficiência supra-renal. Examinamos, dêsse paciente, 7 amostras de soros, com os seguintes resultados:

QUADRO XXIV

RESULTADOS OBTIDOS NO CASO F. P. REFERIDO NO TEXTO

Data	Título pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Título pela técnica de Stein & Van Ngu	Reação de precipitação			
			Antígeno			
			1/5	1/15	1/45	1/135
14/ 6/56	6,5	184	++	+	+	-
27/ 7/56	5,5	197	+++	+++	++	++
28/10/58	4,6	63	-	-	-	-
12/12/58	2,7	28	-	-	-	-
29/12/58	-	-	-	-	-	-
8/ 1/59	2,4	40	-	-	-	-
7/ 4/59	-	-	-	-	-	-

Registramos, também, 5 casos de blastomicose sul-americana que apresentaram sintomatologia nervosa. Um dos pacientes — B. R., 47 anos, masculino, branco, era portador de paraplegia flácida, com lesões cicatrizadas na língua e no ânus. Não teve confirmação laboratorial de blastomicose, no Hospital das Clínicas. Examinamos 3 amostras de soros, com resultados negativos pelas reações da fixação do complemento.

Outro paciente, E. B., era portador de forma localizada na epiglote, em 1956. Em dezembro de 1957, foi operado de tumor cerebral, que se verificou ser blastomicótico, sendo que o paciente faleceu no pós-operatório. Examinamos duas amostras de sôro, uma em julho de 1956, com título 4,5 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e 103 pela técnica de STEIN & VAN NGU e outra em outubro de 1956, com título 2,5 e 22 respectivamente pelas técnicas referidas. Em ambos os soros verificamos auto-precipitação nas provas para pesquisa de precipitinas.

O paciente E. A. S. de 46 anos, masculino, pardo, apresentava blastomicose ganglionar e quadro de paralisia progressiva no lado esquerdo, em 1953. Examinamos 7 amostras de soros em 1954, de

junho a outubro, com título máximo de 2,8 pela prova de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e provas sempre negativas pela técnica de STEIN & VAN NGU. Outra amostra de sôro, examinada em 23/5/58, foi negativa pelas provas de fixação do complemento e de precipitação. O paciente apresentava, então, seqüela de paralisia espástica do lado esquerdo.

O paciente J. P., 43 anos, masculino, branco, apresentava lesão da mucosa oral em 1954 e, em 1956, reação de fixação do complemento positiva no *liquor*. Título de anticorpos fixadores do complemento no sôro, em 28/6/54 — 28/7/55 e 10/2/56, de 10, 15 e 13 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e de 113, 373 e 557 pela técnica de STEIN & VAN NGU.

Finalmente, o caso F. V., 38 anos, branco, masculino, diagnosticado por biopsia de gânglio cervical, estava em tratamento desde dezembro de 1953, quando, em agosto de 1955, passou a apresentar parestesias dos membros inferiores. Internado, em 1/9/55, com diagnóstico de blastomicose pulmonar mais paraplegia flácida por mielite transversa em D₁₁. Este paciente, melhorado, apresenta ainda em 23/6/59, seqüelas da lesão neurológica, reveladas pela marcha. A evolução sorológica dêste paciente foi a seguinte:

QUADRO XXV

RESULTADOS OBTIDOS NO SÔRO DO CASO F.V. REFERIDO NO TEXTO

Data	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
	Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
			1/5	1/15	1/45	1/135
17/ 5/55	17	172				
17/ 9/55	31	1.114				
19/10/55	26	640				
27/ 3/56	11	220	—	—	—	—
15/10/56	12	373	++	—	—	—
10/ 5/57	27	290	++	+	—	—
20/ 8/57	30	845	—	—	—	—
15/ 1/58	16	193	—	—	—	—
11/ 6/58	6	101	—	—	—	—
25/11/58	14	238	—	—	—	—
23/ 6/59	8	149	—	—	—	—

Os exames realizados no *liquor*, dêste caso revelaram os seguintes resultados:

QUADRO XXVI

RESULTADOS OBTIDOS NO LIQUOR DO CASO F. V. REFERIDO NO TEXTO

Data	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
	Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
			1/5	1/15	1/45	1/135
14/ 9/55	6,2					
29/ 9/55	2,8	--				
18/10/55	2,8	--				
2/12/55	--	--	--	--	--	--
4/ 1/56	--	--				
20/ 1/58	--	--	+	--	--	--

As outras quatro observações de nossa casuística consistem de casos particulares que servem para demonstrar o valor diagnóstico das provas imunológicas.

O paciente, A. A., 32 anos, masculino, branco, foi observado a partir de um inquérito epidemiológico, realizado em candidatos a carteira de saúde, no "Instituto Clemente Ferreira", pela reação intradérmica à paracoccidioidina. Realizamos as reações sorológicas em duas amostras de soro com os seguintes resultados: em 16/9/58, reações de fixação do complemento positivas com os títulos de 20 e 353, respectivamente, pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e de STEIN & VAN NGU e reação de precipitação positiva (++) com as diluições 1/5 e 1/15 do antígeno e positiva (+) com a diluição 1/45; em 11/10/58, reações de fixação do complemento positivas, apresentando títulos de 18 e 905, respectivamente, pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e STEIN & VAN NGU e reação de precipitação positiva (++) com diluição a 1/5 do antígeno e positiva (+) na diluição a 1/15. Numerosos exames de escarro negativos para *Paracoccidioides brasiliensis* e para bacilos álcool-ácido-resistentes. Quadro radiológico compatível com o diagnóstico de blastomicose pulmonar.

Outro paciente foi submetido a exames sorológicos por ser filho de doente blastomicótico. Trata-se do paciente E. B., 23 anos,

masculino, branco. Há 10 anos apresenta tosse, escarro e períodos febrís acompanhados de indisposição geral. Por apresentar sorologia positiva, foi submetido a uma série de exames de escarro até resultado positivo para *Paracoccidioides brasiliensis*, o que ocorreu após 1 ano de observação. Fizeram-se então, vários tratamentos de 1 a 2 meses com Sulfa. Após o primeiro tratamento, a melhora foi muito evidente na tosse e na quantidade de escarro. A sorologia deste paciente revelou os seguintes resultados:

QUADRO XXVII

RESULTADOS OBTIDOS NO CASO E. B. REFERIDO NO TEXTO

Data	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
	Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
			1/5	1/15	1/45	1/135
4/ 6/56	5,0	103	—	—	—	—
30/10/56	2,5	56	+	—	—	—
20/ 3/57	2,8	49	+	—	—	—
30/ 7/57	2,5	44	+	—	—	—
11/10/57	3,9	40	—	—	—	—
11/ 3/58	2,7	90	—	—	—	—
31/ 7/58	4,7		+	—	—	—
9/10/58	2,4	101	—	—	—	—
17/ 2/59	2,4	40	—	—	—	—
26/ 5/59	3,0	25	—	—	—	—

As duas últimas observações desta série referem casos em que o diagnóstico de blastomicose foi suspeitado ser incorreto através dos resultados obtidos pela sorologia.

O paciente O. A., 61 anos, masculino, branco, referia a seguinte história: há 2 anos, dor de garganta e lesão da mucosa bucal. A

biopsia revelou tratar-se de blastomicose. Tratamento com Sulfas até cicatrização da lesão mucosa. Continuou, no entanto, com adenopatia cervical e repetiu tratamentos com Sulfas, irregularmente. Atendemos ao paciente, pela primeira vez, em 22/10/58, sendo que a sorologia revelou, pela fixação do complemento, título 2 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e resultado negativo pela técnica de STEIN & VAN NGU e a reação de precipitação também negativa. Outro exame, feito em 27/11/58 revelou o mesmo resultado, após tratamento durante 1 mês, sendo que as condições do paciente continuavam inalteradas. Foi então feita biopsia de gânglio cervical, por nossa sugestão. O exame histopatológico demonstrou tratar-se de carcinoma.

No paciente A. T., 51 anos, masculino, branco, teve início a moléstia em 1951, com ulcerações na laringe, e rouquidão. Foi tratado com Sulfa. Em 1955, necessitou ser traqueostomizado. Em 1958, foi operado das amígdalas. Em outubro de 1958, apareceu gânglio no ângulo direito da mandíbula que aumentou continuamente de tamanho, transformando-se em massa tumoral dura, de limites mal definidos. Continuava traqueostomizado. Tratamento sulfamídico sem melhora da tumoração. Dois exames sorológicos para blastomicose em 19/2/59 e 11/3/59 negativos por fixação do complemento e por precipitação. Resultado de biopsia em 25/3/59 — carcinoma plano celular.

Outra pesquisa que julgamos de interêsse, no estudo da blastomicose sul-americana, foi a da verificação do possível contágio inter-humano. Não se conhecem casos de "blastomicose-doença", em que se possa responsabilizar o contágio inter-humano como origem da infecção. Devido a não dispormos, ainda, de antígeno padronizado para realização de reações intradérmicas na pesquisa de "blastomicose-infecção", procuramos realizar inquérito entre os familiares de pacientes de blastomicose, pela verificação de anticorpos circulantes. Realmente, às vêzes, a "micose-infecção" pode, por maior estímulo antigênico, ocasionar o aparecimento de anticorpos circulantes. Durante os anos de 1956 a 1959 examinamos soros de 47 familiares de doentes de blastomicose sul-americana.

No Quadro XXVIII, estão expostos os resultados encontrados. A primeira coluna refere o grau de parentesco com relação ao doente; a segunda coluna, o número de casos em cada grupo e as outras colunas, o número de resultados positivos da reação de fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER &

MALTANER; o número de resultados positivos da reação de fixação do complemento pela técnica de STEIN & VAN NGU e o número de resultados positivos das reações de precipitação.

QUADRO XXVIII

RESULTADOS OBTIDOS EM FAMILIARES DE DOENTES DE BLASTOMICOSE

Parentesco	N.º de casos	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
		Wadsworth Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
				1/5	1/15	1/45	1/135
Cônjuges	20	1	0	4	2	0	0
Filhos	14	1	1	0	0	0	0
Pais	5	0	0	1	0	0	0
Outros parentes	8	0	0	1	0	0	0
Total	47	2	1	6	2	0	0

Devemos assinalar que o título da única reação positiva entre os cônjuges, na fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER, foi de 2,2; que as 4 reações de precipitação positivas com antígeno a 1/5 e as duas com antígeno a 1/15, eram fracamente positivas e assinaladas com uma cruz (+) somente. A reação de fixação do complemento, positiva pelas duas técnicas utilizadas, no grupo dos filhos, foi obtida somente no caso E. B. referido anteriormente no Quadro XXVII. As outras duas reações de precipitação positivas, uma no grupo dos pais e outra no grupo de outros parentes, eram fracamente positivas (+). Finalmente, queremos ressaltar que só pesquisamos parentes que residiam junto com os doentes de blastomicose e que apresentavam possibilidades de contágio.

COMENTÁRIOS

As provas imunológicas aplicadas no estudo de infecções têm sua eficiência estreitamente vinculada à obtenção de bons antígenos. Porque reconhecemos êste fato é que incluímos, neste trabalho, novas pesquisas sobre o antígeno que utilizamos e que já teve seu

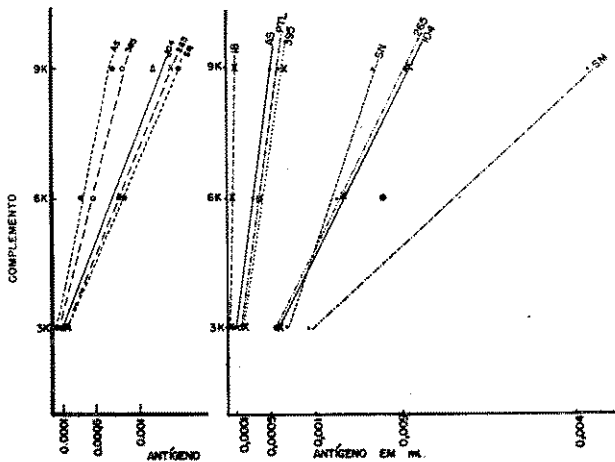
estudo realizado, parcialmente, em nossa tese de doutoramento. Como é referido no Quadro I, a reprodutibilidade do antígeno, que já foi preparado 22 vezes, é muito razoável, dado que a variação na capacidade fixadora é relativamente pequena, de uma partida para outra. Agora sabemos, também, que a conservação do antígeno se faz muito bem em geladeira, em condições estéreis, durante 3 anos, sem variação nas suas propriedades. A natureza polissacarídica do antígeno induziu-nos a realizar as experiências de imunização de coelhos referidas no Capítulo II. Queríamos demonstrar sua condição de antígeno hapteno em relação a este animal. Realmente não verificamos a produção de anticorpos pela injeção endovenosa em coelho. Também não conseguimos demonstrar produção de anticorpos por injeção intramuscular e endovenosa de vacina constituída por suspensão de células leveduriformes mortas pelo calor, do *Paracoccidioides brasiliensis*. A única conclusão possível dessa experimentação limitada seria a de que o *Paracoccidioides brasiliensis*, tal como foi empregado, tem baixo ou nulo poder imunogênico para o coelho.

Interessamo-nos, também, em verificar se tôdas as 8 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, que normalmente utilizamos no preparo do antígeno, seriam produtoras de "polissacarídeo-antígeno". Pesquisas semelhantes foram realizadas por SMITH & colab. (1950) e PAPPAGIANIS & KOBAYASHI (1958), no que diz respeito à obtenção de coccidioidina; por SCHUBERT & colab. (1953), no estudo do valor antigênico de vários lotes de histoplasmina e por SCHUBERT & AJELLO (1957), na verificação das diferenças entre várias amostras de *Histoplasma capsulatum* empregadas como antígeno, sob forma de células leveduriformes, em reações de fixação do complemento.

Numa experiência preliminar (Quadro II), verificamos que as amostras 18 e AS de *Paracoccidioides brasiliensis* liberavam maior quantidade de "polissacarídeo-antígeno", comparativamente às outras amostras, apresentando por isso, poder fixador ótimo para 3 e 6 unidades de complemento, em diluições maiores. Repetimos a experiência, anotando também, as percentagens das suspensões de que partimos para extração dos antígenos em relação ao peso das células (Quadro III). Realizamos para análise mais pormenorizada dessas preparações, curvas de isofixação para o sistema blastomicose (Quadros IV a VI e Gráfico 2), como aconselhado por ALMEIDA (1956), e cálculos feitos de acôrdo com RAPPORT & GRAFF (1957). As curvas de isofixação indicavam que, usando 0,02 ml do sôro (no caso mistura de soros de pacientes de blastomicose), estávamos

utilizando excesso de anticorpos e, portanto, maior fixação de complemento iria depender unicamente de maior quantidade de antígeno presente. Tínhamos, então, condições ideais para obtenção das linhas de regressão antígeno-complemento, como foram feitas (Quadros VII a XIV e Gráfico 3). Já na experiência anterior, empregando o mesmo método de trabalho, conseguimos linhas de regressão antígeno-complemento para 5 antígenos de amostras separadas (Gráfico 1). Podemos observar, pela comparação dos Gráficos 1 e 3, representados no Gráfico 4, que as diferenças entre os antígenos se verificaram de modo semelhante nas duas experiên-

GRÁFICO 4
GRÁFICOS 1 E 3 FOTOGRAFADOS LADO A LADO PARA COMPARAÇÃO



cias. Este tipo de inscrição gráfica, igual ao utilizado por ALMEIDA (1958), indica, quando tôdas as linhas de regressão convergem para um mesmo ponto, que as diferenças entre as várias preparações são quantitativas.

Reconhecemos que o número de experiências realizadas nesta verificação foi insuficiente para conclusões definitivas, mas a coincidência dos resultados, obtido nas duas vêzes, parece indicar, com certa segurança, que existem amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* que libertam maior quantidade de "polissacarídeo-antígeno", comparativamente a outras.

Iniciando os comentários referentes ao capítulo de resultados, devemos definir nosso ponto de vista no modo de encarar o estudo imunológico de uma infecção qualquer. Ele tem seus fundamentos no que acontece quando agente infeccioso penetra o organismo de hospedeiro suscetível. A penetração do agente infeccioso pode causar:

- a) Infecção (sem doença), na qual não existem manifestações clínicas e só podemos dela tomar conhecimento

quando dispomos de prova intradérmica fiel, que nos revelará a produção de anticorpos cuti-sensibilizadores por parte do organismo infetado;

- b) Infecção benigna, em que há sinais clínicos da moléstia, mas esta evolui espontaneamente para a cura. Nestes casos, além da positivação da prova intradérmica, verifica-se a produção de anticorpos circulantes que persistem durante tempo variável no sangue do hospedeiro, após a cura da infecção. Neste tipo de infecção, devido às manifestações clínicas presentes, podemos estabelecer com certa precisão o tempo necessário ao aparecimento de anticorpos cuti-sensibilizadores e dos vários tipos de anticorpos circulantes após o início da infecção. Sabemos que anticorpos cuti-sensibilizadores persistem no organismo infetado geralmente pelo resto da vida e quando desaparecem só o fazem muito tardiamente. Aqui temos, no entanto, um tipo de infecção que se presta muito bem para verificar quanto tempo demora para desaparecerem os anticorpos circulantes após a cura clínica;
- c) Infecção grave, sob forma crônica progressiva ou de infecção generalizada. Nestes casos pode-se verificar reação intradérmica negativa, correspondendo a mau prognóstico, pois indica fase de anergia do organismo infetado. Os anticorpos circulantes geralmente estão presentes em níveis variáveis, de acordo com a etiologia da infecção.

Já vimos, no Capítulo I, o que se conhece da imunologia da coccidioidomicose, histoplasmose, blastomicose norte-americana e blastomicose sul-americana. Poderemos salientar o trabalho de SMITH & colab. (1950) sobre a coccidioidomicose, cujos achados podem muito bem ser enquadrados no esquema que acabamos de traçar. Não vamos discutir o que se passa em outras micoses profundas, mas chamar a atenção para nossos achados no estudo imunológico da blastomicose sul-americana.

Durante a execução deste trabalho, não dispúnhamos de antígeno padronizado para a execução de reações intradérmicas. Colaboramos no entanto, em trabalho de LACAZ & colab. (1959), onde parece ser conclusão lógica que a blastomicose-infecção existe. Nada sabemos sobre a possível importância da reação intradérmica no prognóstico dos casos de blastomicose sul-americana. Conclusões

dêsse tipo, além de dependerem de reação intradérmica digna de confiança, necessitam seguimento prolongado dos pacientes para serem alcançadas.

Dos resultados do presente trabalho, conseguidos através da pesquisa de 2 tipos de anticorpos circulantes (precipitinas e fixadores do complemento), várias conclusões podem ser obtidas.

Inicialmente chama a atenção do exame dos Quadros XVI a XX o pequeno número de formas localizadas da blastomicose sul-americana existente em nossa casuística, já que 22 casos, num total de 220, constituem apenas 10%. Esta pequena incidência de formas localizadas parece depender da falha em se diagnosticarem formas benignas, iniciais e localizadas da moléstia. Queremos chamar a atenção do leitor para o fato de que o esquema a que submetemos o estudo imunológico da blastomicose sul-americana não corresponde exatamente ao agrupamento de nossos resultados, isto é, as formas benignas de infecção geralmente são localizadas, mas algumas podem apresentar certa disseminação, como em raros pacientes que observamos, de lesão pulmonar e mucosa. Nestes casos encontramos comportamento imunológico próprio da forma localizada da infecção e a evolução clínica após o tratamento demonstra que são formas benignas. No grupo de formas localizadas, pudemos verificar, como já assinalamos, a inclusão de alguns casos de formas disseminadas, como o reexame clínico demonstrou, depois que o comportamento imunológico levantou a suspeita. Pela análise dos Quadros XVI e XVII, verificamos que as precipitinas estavam presentes em 100% dos pacientes em que a evolução da moléstia era de menos de 1 ano, enquanto que os anticorpos fixadores do complemento estavam presentes em 66,6% dos casos. Isto indica que, destes anticorpos circulantes, as precipitinas aparecem mais precocemente e os anticorpos fixadores do complemento mais tardiamente. Nos pacientes em que a duração da moléstia era de mais de 1 ano, as precipitinas foram positivas somente em 40% dos casos, o que indica que estes anticorpos desaparecem mais rapidamente da circulação. Podemos verificar que o comportamento dos anticorpos fixadores do complemento foi diferente, pois a percentagem de positividade é maior naqueles casos em que a duração da moléstia era de mais de 1 ano. Outro fato importante, que se verifica pela análise dos Quadros XVI e XVII, é que o teor em anticorpos fixadores do complemento (título médio geral), nos soros dos pacientes com moléstia durando mais de 1 ano, é significativamente menor do que naqueles apresentando moléstia com duração de menos de 1

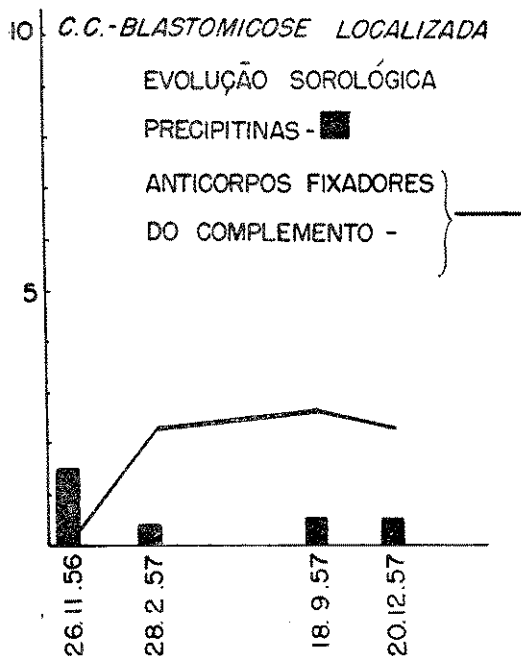
ano. Em nossa opinião isto indica circunscrição do foco infeccioso por parte do organismo que, então, fica sujeito a menor estímulo antigênico.

Os resultados encontrados, neste grupo de pacientes, foram os seguintes: precipitinas aparecendo precocemente e também desaparecendo rapidamente da circulação; anticorpos fixadores do complemento aparecendo mais tardiamente em teor sempre baixo, porém maior nas formas de curta duração e persistindo durante muito tempo. Estes achados são confirmados pelo estudo evolutivo dos pacientes (Quadro XXI). Em alguns pacientes dêste grupo, o tratamento proporciona cura clínica que não se acompanha de cura imunológica e isto é indicado pela persistência das precipitinas (caso C.C. do Quadro XXI, representado no Gráfico 5. Neste gráfico, bem como nos demais que representam o estudo evolutivo de pacientes, as ordenadas representam os títulos de anticorpos fixadores do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER. As colunas representam, em altura, a soma das cruzes conferidas às reações de precipitação com as 4 diluições do antígeno, sendo que 1 cruz foi representada por 1 mm de altura). A imunologia indica, então, que a moléstia não está curada e recaídas podem ocorrer pela interrupção do tratamento.

Pela análise dos Quadros XVIII e XIX, concluímos que as formas disseminadas da blastomicose sul-americana se caracterizam

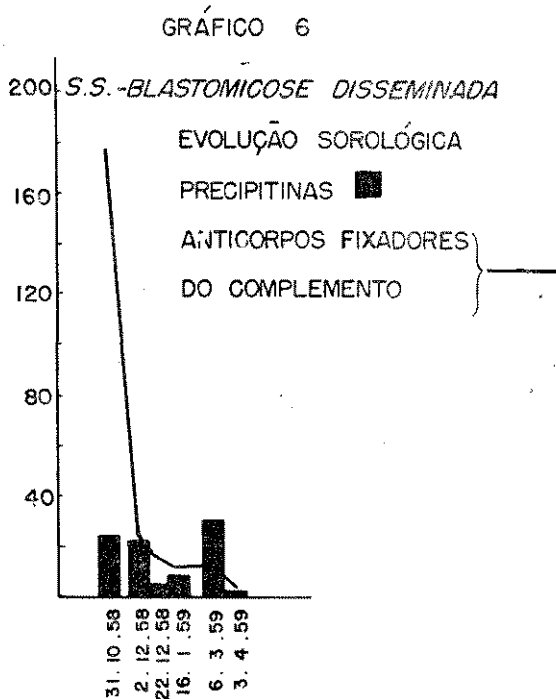
imunologicamente por apresentarem alto teor de anticorpos fixadores do complemento. Raramente encontramos ausência de anticorpos fixadores do complemento em pacientes dêste grupo, pois a reação nos dá sensibilidade de 95% e 96,3% respectivamente para

GRÁFICO 5



os que apresentam evolução de menos de 1 ano e de mais de 1 ano. Também as precipitinas estão presentes na maioria dos casos, com freqüência de 78% e 74,8%. Pensamos que a alta percentagem de reações de precipitação positivas em pacientes com moléstia de longa duração corresponde, em nossa casuística, principalmente a termos feito na organização dos Quadros XVIII e XIX a anotação do primeiro exame dos pacientes e em sua maioria eles compareciam ao exame por apresentarem recaída da moléstia. Realmente a observação do Quadro XXII, que contém o estudo evolutivo desses pacientes, nos ensina que as precipitinas desaparecem com certa rapidez quando o paciente é submetido a tratamento eficiente, para reaparecerem por ocasião das recaídas. A presença de precipitinas no sôro dos pacientes desse grupo indica, a nosso ver, atividade da moléstia. Já verificamos a correspondência de reações de precipitinas positivas com outras provas da chamada fase aguda do sôro (FAVA NETTO & colab., 1959). Frequentemente o reaparecimento das precipitinas se acompanha simultânea ou posteriormente da elevação do teor de anticorpos fixadores do complemento. Pelo exame do Quadro XXII, verificamos, ainda, que os anticorpos fixadores do complemento persistem durante muito tempo

após a cura clínica do paciente. A positividade da reação, com teor de anticorpos de título igual ou maior que 10 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER indica, a nosso ver, que a terapêutica não pode ser interrompida. Em certos pacientes desse grupo a queda do teor de anticorpos fixadores do complemento é rápida e grande, indicando que eles se comportam imunologicamente como casos agudos. O Gráfico 6 (ca-



so S. S.) representa evolução dêsse tipo. Em outros casos o estudo evolutivo não indica melhora imunológica correspondendo à melhora clínica, que é muito rápida e evidente (caso J. R. — Quadro XXII). Seria exemplo de forma disseminada crônica. O Gráfico 7 representa a evolução sorológica em caso resistente ao tratamento sulfamídico. Verificamos, nêsse caso (P. T. L. — publicado por CUNHA & colab., 1959), a

elevação progressiva do teor em anticorpos até 19/8/1957, quando, por influência de tratamento associado com Sulfa mais Vitamina D₂ (iniciada em dezembro), melhora clínica se acompanhou de queda do teor de anticorpos. Em junho de 1958, no entanto, o paciente apresentava recaída da moléstia sob a forma septicêmica, com elevação dos anticorpos fixadores do complemento. É exemplo, portanto, de recaída clínica e sorológica. O Gráfico 8 nos mostra recaída unicamente sorológica. Trata-se do paciente P. C. que, durante o período de observação, manteve-se clinicamente

curado, apresentando somente queixas mal definidas mas teve recaída da moléstia, revelada somente pela sorologia, durante o segundo semestre de 1957. Como regra, o comportamento imunológico dos pacientes dêsse grupo se caracteriza por alto teor em anticorpos fixadores do complemento, precipitinas presentes sempre que a moléstia se encontra em atividade, desaparecimento das precipitinas em numerosos casos por influência do tratamento e queda progressiva no teor dos anticorpos fixadores do complemento. Recaídas são freqüentes com reaparecimento das precipitinas e aumento do teor de anticorpos fixadores do complemento. As recaídas podem ser clínicas e sorológicas ou somente sorológicas.

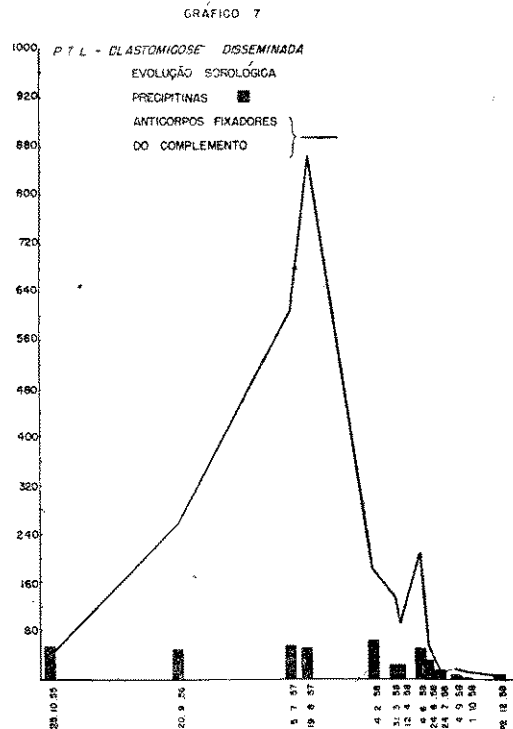
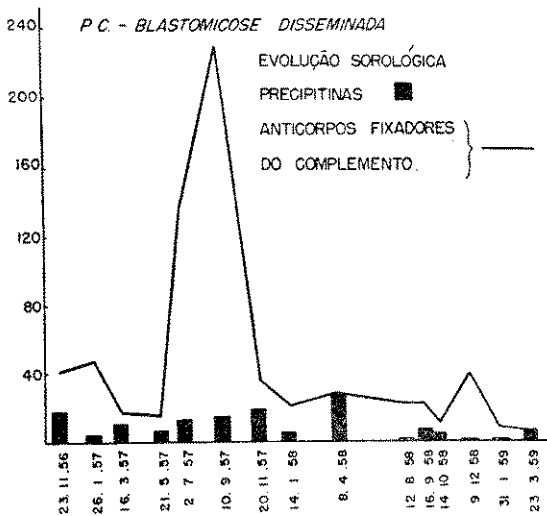


GRAFICO 8



O que caracteriza o grupo de formas clinicamente curadas (Quadro XX) é a percentagem baixa de reações de precipitação positivas, a frequência ainda relativamente elevada de reações de fixação do complemento positivas, e o baixo teor de anticorpos fixadores de complemento encontrado no sêro desses pacientes. Em muitos desses pacientes, acreditamos que esse baixo teor de anticorpos fixadores

do complemento, com reação de precipitação negativa, indique verdadeira cicatriz sorológica, sendo que devem ser considerados curados. O estudo evolutivo desses casos (Quadro XXIII) demonstrou-nos que a suspensão do tratamento pode ser feita após a estabilização por 6 meses ou mais do teor de anticorpos em título menor que 5. Neste quadro incluímos casos de cura clínica, com negatificação completa das reações sorológicas (casos F. G. e M. P.), indicando que, certamente, há casos de cura da blastomicose sul-americana, pois o caso M. P. está curado há 10 anos.

Em nossos resultados, mostramos ainda a possibilidade de associação da blastomicose com outras moléstias, como a lepra e a tuberculose. Chama a atenção, nos dois casos de associação com tuberculose, termos verificado baixos níveis de anticorpos fixadores de complemento, fato que não podemos saber se devido a serem infecções localizadas de blastomicose ou à associação com tuberculose.

O caso em que a blastomicose produziu mal de Addison e aqueles em que a mesma apresentou localização nervosa, são aqui referidos principalmente com a finalidade de chamar a atenção que a imunologia pode auxiliar pouco no diagnóstico clínico. Realmente, por se tratar de localizações metastáticas e, na maior parte das vezes, lesões limitadas, não encontramos os anticorpos circulantes em altos níveis. Faz exceção o caso F. V., em que a localização nervosa se verificou quando a moléstia ainda se apresentava em plena atividade, com altos níveis de anticorpos fixadores no sangue,

apresentando também anticorpos fixadores do complemento no liquor. Verificamos por êste caso que a evolução pode ser acompanhada através de reações praticadas no liquor. A grande importância que conferimos à apresentação dessas formas nervosas é a sua freqüência; em cêrca de 300 casos, aqui apresentados, 5 tinham sinais de localização nervosa. Devemos assinalar que, para 60 casos de blastomicose sul-americana, encontra-se 1 com localização nervosa. O diagnóstico é realmente difícil e julgamos que se deve sempre ter em mente a localização metastática no sistema nervoso central, dando-se o devido valor à informação da existência de blastomicose no passado.

Apresentamos, em nossa casuística, 2 casos de blastomicose descobertos através do estudo imunológico, o que vem demonstrar o interesse da imunologia na orientação do diagnóstico.

Maior interesse apresentam os últimos 2 casos que referimos e nos quais chegou-se a diagnóstico de câncer quando o estudo imunológico revelou que era pouco provável a etiologia blastomicótica.

Quanto aos resultados obtidos em familiares de doentes de blastomicose, o estudo foi realizado justamente com a finalidade de comprovar que os resultados seriam negativos. Na realidade, clinicamente não haviam sido descritos casos de contágio inter-humano da blastomicose sul-americana e só poderíamos esperar resposta em anticorpos circulantes em indivíduos que apresentassem sintomas da infecção. Não podemos saber se o contágio se faz sob a forma de blastomicose-infecção. Esta investigação poderá ser feita através da realização de provas intradérmicas, com antígenos padronizados. O caso de blastomicose que encontramos através dêsse estudo, segundo nossa opinião, encontra explicação mais lógica numa possível contaminação a partir da mesma fonte de infecção do que na transmissão inter-humana. Esta verificação de caso de blastomicose em filho de doente poderá, no entanto, sofrer outra interpretação, desde que se demonstre, por outros meios, que o contágio inter-humano existe.

CONCLUSÕES

O antígeno que empregamos demonstrou-se eficiente em reações de precipitação e de fixação do complemento. Consegue-se boa reprodutibilidade nos resultados quando se trabalha com várias amostras de *Paracoccidoides brasiliensis* na sua obtenção. As curvas de isofixação mostram que êle pode ser titulado facilmente,

empregando-se o método da titulação cruzada, onde são usadas várias diluições do antígeno contra várias diluições de soro positivo.

O antígeno é bom no que diz respeito à conservação, pois suas propriedades antigênicas não se alteram quando mantido em geladeira, em condições estéreis, durante 3 anos.

O *Paracoccidioides brasiliensis* parece ter baixo ou nulo poder imunogênico para o coelho, quando empregado sob forma de células leveduriformes mortas pelo calor.

Verificamos diferenças quanto à capacidade de liberação de "polissacarídeo-antígeno" pelas diversas amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Essas diferenças são quantitativas.

A associação de duas provas sorológicas — precipitação e fixação do complemento — permitiu-nos revelar anticorpos nos soros de 98,4% dos pacientes de blastomicose sul-americana.

O estudo imunológico de 220 casos de blastomicose sul-americana possibilitou-nos classificar os casos de "blastomicose-doença" em duas formas principais:

- a) blastomicose benigna, que geralmente se apresenta sob forma localizada e que se caracteriza por apresentar baixo teor em anticorpos fixadores do complemento; nossos achados indicam-nos que as precipitinas são os anticorpos que aparecem primeiro e também são os primeiros a desaparecer.
- b) blastomicose grave, moléstia disseminada que clinicamente se apresenta sob a forma crônica progressiva, ou sob forma generalizada e que se caracteriza por apresentar alto teor em anticorpos fixadores do complemento e precipitinas presentes, sempre que a moléstia se encontra em atividade.

O estudo imunológico evolutivo, que fizemos em pacientes de blastomicose, permitiu-nos verificar que geralmente as precipitinas são os primeiros anticorpos que desaparecem da circulação, quando o paciente é tratado eficientemente. Constituem, por outro lado, indicação, às vezes, mais precoce que o aumento do teor em anticorpos fixadores do complemento, de recaída da moléstia, quando reaparecem na circulação.

Os anticorpos fixadores do complemento persistem durante mais tempo na circulação após a cura clínica. Acompanhando a cura clínica, geralmente verificamos a queda no seu teor, sendo raros

os casos em que a baixa no teor é muito lenta e posterior à cura clínica. As recaídas, geralmente, são acompanhadas de elevação significativa no teor em anticorpos fixadores do complemento. São raros os casos em que só reaparecem as precipitinas e aqueles por nós observados foram submetidos a novo tratamento. No estudo evolutivo de caso de blastomicose, quando o título em anticorpos fixadores do complemento fôr superior a 10 (técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER) ou as precipitinas estiverem presentes, não se deve interromper o tratamento. Em alguns casos, o título inferior a 5 parece constituir cicatriz sorológica e julgamos que o tratamento poderá ser interrompido quando isto se verificar por mais de 6 meses.

Verificamos a ocorrência de recaídas reveladas unicamente pelo estudo sorológico.

Há raros casos de blastomicose sul-americana nos quais os anticorpos circulantes estão ausentes.

Existem em nossa casuística casos curados clínica e sorologicamente. Pensamos que eles realmente possam existir em maior número, desde que os casos de forma benigna da moléstia constituem a minoria em nosso trabalho.

Nossas pesquisas indicam que a imunologia é de pequena ajuda no diagnóstico de formas localizadas e metastáticas da moléstia, como verificamos nas localizações nervosas e das glândulas supra-renais.

Demonstramos, em alguns casos, o grande valor diagnóstico assumido pelas provas sorológicas, quando interpretadas à luz dos dados clínicos.

Não conseguimos demonstrar, pelo estudo sorológico de familiares de pacientes de blastomicose, o contágio inter-humano da moléstia.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE IMMUNOLOGICAL STUDY OF SOUTH AMERICAN BLASTOMYCOSIS

In the first chapter of the paper a review is made of the literature concerning the immunology of the more important deep mycosis. Types of antigens, immunological reactions used, cross reactions observed and the results supplied by the immunological study are described. In this way, a review of the literature about Coccidioidomycosis, Histoplasmosis, North American Blastomycosis

and South American Blastomycosis is made. Regarding the South American Blastomycosis, suggestions are made to achieve a better knowledge on the immunology of this disease.

In chapter two, the material and methods used in complement fixation and precipitin reactions are described. In this chapter, some findings about the antigen are included. First, a table (table I) with data regarding 22 batches of antigen prepared up to 1959 are presented. The data refer to the strains of *Paracoccidioides brasiliensis*, the days of culturing and the optimal fixing capacity of the antigens with 3 and 6 units (50% hemolysis) of complement.

An experiment on preservation of the antigen is recorded. It can be kept in the ice-box under sterile conditions without preservative for a period of time as long as three years. Under these conditions there is no modification in the properties of the antigen. In this chapter it is also reported an experiment about immunization of rabbits using as antigen the polysaccharide and a suspension of yeast-like cells of *P. brasiliensis*. It was not possible to obtain any antibody in the experiments which were carried out with only two rabbits, and the results have been included in order to call the attention about the difficulty of obtaining hyperimmune serum from these animals. Another experiment recorded in this chapter deals with the possibility of obtaining "polysaccharide-antigen" from each strain employed in the preparation of the antigen (most times 8 strains were used — table I).

In order to make this study, iso-fixation curves were prepared as advised by Almeida in 1956. The protocols of these experiments are given in tables II to XIV and the results are represented in diagrams 1 to 3.

Each one of the eight antigens was obtained from a separate strain of *P. brasiliensis* and it was also tested in the precipitin reactions with a human serum from a patient with South American Blastomycosis. All antigens gave positive results as can be seen in table XV. In this chapter, the principal features of the complement fixation reactions which had been studied in a previous work as well as the technique followed in the precipitin reaction are also mentioned.

In chapter III, the results of precipitin and complement fixation reactions in 220 patients of South American Blastomycosis are presented, each serum was tested by the two kinds of reaction at the same time. The results of complement fixation (Wadsworth,

Maltaner & Maltaner) and of the precipitin reactions in 22 cases of localized forms of South American Blastomycosis are presented. Some cases had had the disease for less than one year (table XVI) and others for more than one year (table XVII) when their blood was collected.

Tables XVIII and XIX show the results observed in the disseminated forms of South American Blastomycosis in 59 patients with less than one year of duration and 107 patients with more than one year of duration before their sera were tested. In table XX, results concerning 32 patients considered clinically cured when their blood was collected are presented.

In table XXI, there are the results of the immunological follow-up of 10 patients with the localized form of South American Blastomycosis who were chosen according to increasing periods of illness duration before collection of the first blood specimen. It can be seen that some of these cases were classified in this group at the beginning of the observation but according to their immunological behavior they were cases of disseminated forms of South American Blastomycosis (e.g. case A.A. in the table XXI).

In table XXII, we have the immunological follow-up of fifteen cases of disseminated forms of the disease chosen according to increasing periods of illness duration before collection of the first blood specimen. In table XXIII, likewise, we have the immunological follow up of seven cases of clinically-cured forms. Some cases in the last three tables had only one serum tested and they were included on account of the period of evolution of the disease and in order to demonstrate the general behavior in each group. In this chapter are also presented the results of the immunological study of 1 case of South American Blastomycosis associated with leprosy, 2 cases associated with tuberculosis, 1 case with Addison's disease, because of the metastatic localization of the illness in the adrenals, 5 cases with metastatic localization of the disease in the central nervous system, 2 cases in which the diagnosis of cancer was made after the immunological examination suggested that they were not cases of South American Blastomycosis and two cases of South American Blastomycosis in which the diagnosis was first made by the immunological data.

Finally, we have the results of an immunological study among 47 relatives of the patients which was made with precipitin and complement fixation reactions in order to show the inter-human transmission (table XXVIII).

Chapter IV records the discussion of the results obtained regarding the antigen employed, the preservation of the antigen and the preparation of antigen from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Regarding the patients of South American Blastomycosis, an attempt is made to adjust the results to a very general scheme of the evolution of an infection when a microorganism penetrates the human body. When this happens, the following may occur:

- a) infection without disease
- b) mild infection — generally localized forms
- c) severe illness — disseminated forms

It is emphasized that the author had not a good antigen for making skin tests and that the first of these forms, e.g., blastomycosis infection without disease, has not been demonstrated. Studies made in 1959 by Prof. Lacaz *et alii* suggest that this form exists in the South American Blastomycosis like in other deep mycosis.

Regarding the localized forms of South American Blastomycosis it may be remarked: a) the rarity with which they were observed in this research, only ten per cent; b) the time of appearance of the two kinds of antibody; c) the low titer of the complement-fixing antibody; d) the persistence of the antibody in the sera of the patients after treatment. The precipitin was the first antibody to appear in the blood of the patients and the first to disappear after treatment. Diagram 5 records the immunological evolution of a typical case of this form of South American Blastomycosis.

Regarding the disseminated forms of South American Blastomycosis, the higher titer observed in the complement-fixation reaction may be remarked. These titers may come down with some rapidity after treatment in cases supposed to be of acute disseminated forms, as shown in diagram 6. In other cases, treated with sulphadruugs without improvement, the titer remains high as shown in the diagram 7, where the titer only came down when the patient was subjected to other treatments like sulpham and D₂ vitamin in December, 1957, and Amphotericin B in June, 1958. In this case, clinical and serological relapses could be seen. In other chronic cases, a clinical cure may be achieved without decrease in the titer of fixing antibodies (as we can see in Table XXII — case J. R.). In diagram 8 there is a case of serological relapse during the year of 1957 without symptoms or signs of clinical relapse. Regarding the precipitin in the disseminated forms, it is present when the disease is in activity.

The follow-up of the clinically cured cases shows that the complement-fixing antibody remains in the sera after the treatment, and after precipitin has vanished, as revealed by the high percentage of complement-fixation reaction positive in these cases. A discussion is made of the cases associated with other illnesses, of the cases of metastatic localization in adrenals and central nervous system, and of the investigation in relatives of the patients.

Chapter V records the conclusions of the present work. First, about the antigen used (a polysaccharide from *Paracoccidioides brasiliensis*):

- a) this antigen is good for the precipitin and complement-fixation reactions;
- b) it can be obtained easily using various strains of *Paracoccidioides brasiliensis*;
- c) it can be titrated very well by block titration;
- d) it can be kept in the refrigerator for a period as long as 3 years without any modification in its properties;
- e) the yield of polysaccharide is quantitatively different in different strains of *P. brasiliensis*.

The immunological study of 220 patients of South American Blastomycosis allows the following conclusions:

Using the two kinds of test — precipitin and complement fixation reactions — circulating antibodies may be demonstrated in 98.4% of the patients of South American Blastomycosis. These patients can be classified into two main clinical immunological forms.

- a) mild-blastomycosis, usually of the localized forms and characterized by a low titer in complement-fixing antibody. In these forms the precipitin is the first antibody to appear in the serum of the patients and the first to disappear after treatment;
- b) severe-blastomycosis, clinically manifested as disseminated or generalized forms and immunologically characterized by high titer of complement-fixing antibody and precipitin reaction positive when the illness is in activity.

The immunological follow up showed that the precipitin is the first antibody to disappear in the serum of these patients when they receive a good treatment. On the other hand, the precipitin is the first antibody to reappear in the circulation by the time of the occurrence of relapses of the disease.

The complement-fixing antibody remains for a long time in the blood of the patients clinically cured. In the majority of cases a decrease in the titer of these antibodies can be found at the same time as the clinical improvement. The cases where the titers show a late fall, after some time of clinical improvement, are rare. The clinical relapses are accompanied by a rise in the titer of complement-fixing antibodies. The cases in which only precipitin reappears are rare and some of them have been treated again.

In the evolution of a case when the titer in complement-fixing antibody is higher than 10 (by the technique of Wadsworth, Maltaner and Maltaner), or if the precipitin reaction is positive, the treatment should not be interrupted. In some cases, the titer below 5, when observed over a period of time lasting more than 6 months, may be considered a "serological scar" and the treatment can be interrupted. There are relapses that were characterized only by the serological result without clinical manifestation. Very rare cases of South American Blastomycosis do not present any precipitin or complement-fixing antibodies in the blood.

In this paper, some cases have been reported with clinical and serological cure, and the true number may be higher on account of the very low number (only 10%) of localized forms registered here. The immunological study does not help so much in metastatic localized forms of South American Blastomycosis as in the nervous and adrenals localizations referred in this paper. On the other hand, cases are presented where the immunological study associated with clinical data was of much help in the diagnosis. In the study of the relatives of patients with South American Blastomycosis it was not possible to demonstrate any inter-human transmission by the precipitin and complement fixation reactions.

AGRADECIMENTOS

Queremos agradecer aos colegas e amigos que tornaram possível êsse trabalho. Ao nosso mestre Prof. Carlos da Silva Lacaz agradecemos a amizade de sempre, o estímulo e o ambiente de trabalho que nos proporcionou. Nossos agradecimentos aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia que sempre se mostraram dispostos a nos auxiliar nesta pesquisa.

Devemos agradecer aos colegas da Clínica de Doenças Tropicais e Infetuosas (Serviço do Prof. João Alves Meira), Drs. Gildo Del Negro, Cecília Magaldi e Vicente Amato Neto; da Clínica Derma-

tológica (Serviço do Prof. João de Aguiar Pupo), Dr. Sebastião de Almeida Prado Sampaio e da Clínica Otorrinolaringológica (Serviço do Prof. Raphael da Nova), Dr. Lamartine de Paiva, pela ajuda na coleta de sangue de doentes de blastomicose. Somos gratos, igualmente, ao Dr. Manoel Caetano Passos Filho, do "Instituto Clemente Ferreira", que nos enviou para contrôlo sorológico pacientes observados naquele Instituto.

Durante a execução do presente trabalho, vários colegas foram consultados e aqui deixamos os nossos agradecimentos ao Prof. Otto Bier, Drs. Octavio A. Germack e Michel Pinkus Rabinovitch, bem como a todos que nos auxiliaram.

Agradecemos ao técnico Victor Salcedo Vega pela dedicada ajuda no preparo dos antígenos; à técnica Ida Mello Sciannaméa, pelo prestimoso auxílio na execução das reações. À Sra. Hercy de Souza Valle, pela dedicada colaboração na parte de datilografia e mimeografia.

Agradecemos o precioso auxílio recebido do Instituto Adolfo Lutz na elaboração do presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, F. & C. S. LACAZ — 1941 — I. Intradermo reação com paracoccidioidina no diagnóstico do granuloma paracoccidióidico. II. A reação de Montenegro no granuloma paracoccidióidico. *Folia Clin. et Biol.* 13: 177-182.

ALMEIDA F. & C. S. LACAZ — 1942 — Valor das intradermo-reações no diagnóstico das micoses. *An. Fac. Med. Univ. São Paulo* 18: 125-136.

ALMEIDA, F., C. S. LACAZ & A. C. CUNHA — 1945 — Intradermo-reação para o diagnóstico da blastomicose sul-americana (granulomatose paracoccidióidica). *Arq. Bras. Med.* 35: 267-272.

ALMEIDA, J. O. — 1956 — Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement fixation tests. *J. Immunol.* 76: 259-263.

ALMEIDA, J. O. — Contribuição para o estudo da reação de fixação do complemento em lepra. Tese de concurso para catedrático de Microbiologia e Imunologia Aplicadas na Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1958.

BASGAL, W. — Contribuição ao estudo das blastomicoses pulmonares. Tese de doutoramento. Rio de Janeiro, Leuzinger, 1931.

BEADENKOPF, W. G. *et alii* — 1949 — Tuberculin, coccidioidin and histoplasmin sensitivity in relation to pulmonary calcifications; a survey among 6.000 students at the University of Chicago. *Pub. Health Rep.* 64: 17-32.

CAMPBELL, C. C. & S. SASLAW — 1948 — The use of yeast phase antigens in a complement fixation test for Histoplasmosis. II. Results with ground antigens. *J. Lab. Clin. Med.* 33: 1207-1211.

CAMPBELL, C. C. & S. SASLAW — 1949 — The use of yeast phase antigens in a complement fixation test for histoplasmosis. III. Preliminary results with human sera. *Pub. Health Rep.* 64: 551-560.

CAMPBELL, C. C. — 1953 — Antigenic fractions of *Histoplasma capsulatum*. *Am. J. Publ. Health* 43: 712-717.

CAMPBELL, C. C. & G. E. BINKLEY — 1953 — Serologic diagnosis with respect to *histoplasmosis*, *coccidioidomycosis* and *blastomycosis* and the problem of cross-reactions. *J. Lab. Clin. Med.* 42: 896-906.

CARVALHO, A. — 1953 — Sobre o emprego da paracoccidioidina na cidade do Rio de Janeiro (Primeiros resultados baseados no estudo de 475 indivíduos). *Rev. Brasil. Tuberc.* 21: 73-82.

CARVALHO, A. — Sobre o uso intradérmico da paracoccidioidina (filtrado e suspensão) como meio auxiliar de diagnóstico na doença de Lutz. Rio de Janeiro, Editorial Sul Americano, 1958.

COHEN, R. — 1949 — Coccidioidomycosis. Cases studies in children. *Arch. Pediat.* 66: 241-265.

CONANT, N. F. *et alii* — Manual of clinical mycology. Philadelphia, W. B. Saunders, 1954.

CROSS, F. W. & A. HOWELL — 1948 — Studies of fungus antigens. II. Preliminary report on the isolation of an immunologically active polysaccharide from histoplasmin. *Publ. Health Rep.* 63: 179-183.

CUNHA, J. C. P. *et alii* — 1959 — Forma linfático-tegumentar da blastomicose sul-americana complicada com disseminação hematogênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. Remissão pela Anfotericina B. *Rev. Hosp. Clin.* 14: 279-287.

DEL NEGRO, G. & J. L. FARIA — 1954 — Reação à paracoccidioidina em cobaias. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* 1: 156-165.

DICKSON, E. C. & M. A. GIFFORD — 1938 — Coccidioides infection (Coccidioidomycosis). II. The primary type of infection. *Arch. Int. Med.* 62: 853-871.

DOUAT, N. E. & V. M. DIAS — 1958 — Intradermorreações de paracoccidioidina, coccidioidina e histoplasmina. Resultados dos testes em 300 indivíduos. *Rev. Brasil. Tuberc.* 26: 663-668.

DYSON, J. E. & E. E. EVANS — 1954 — Skin test antigens from yeast phase cultures of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Univ. Michigan M. Bull.* 20: 53-61.

EDWARDS, L. B., I. LEWIS & C. E. PALMER — 1948 — Studies of pulmonary findings and antigen sensitivity among student nurses. III. Pulmonary infiltrates and mediastinal adenopathy observed among student nurses at the beginning of training. *Publ. Health Rep.* 63: 1569.

EDWARDS, P. Q. & C. E. PALMER — 1957 — Prevalence of sensitivity to coccidioidin, with special reference to specific and nonspecific reactions to coccidioidin and to histoplasmin. *Dis. Chest* 31: 3-28.

EMMONS, C. W., B. J. OLSON & W. W. ELDRIDGE — 1945 — Studies of the role of fungi in pulmonary disease. I. Cross reactions of histoplasmin. *Pub. Health Rep.* 60: 1383-1394.

FAYA NETTO, C. — 1955 — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clín. Exper.* 18: 197-254.

FAYA NETTO, C., R. G. FERRI & C. S. LACAZ — 1959 — Proteinograma e algumas "provas da fase aguda do sôro" na blastomicose sul-americana. Estudo comparativo com as reações de fixação do complemento e de precipitação. *Med. Cir. Farm.* 277: 157-163.

FONSECA, O. & A. E. A. LEÃO — 1927 — Réaction cutanée spécifique avec le filtrat de culture de *Coccidioides immitis*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 97: 1796-1797.

FONSECA, O. & A. E. A. LEÃO — 1927 — Déviation du complément dans le granulome coccidioidal. Sensibilité du filtrat de culture de *Coccidioides immitis*, employé comme antigène. *Compt. Rend. Sec. Biol.* 97: 1776-1777.

FRIEDMAN, L. & N. F. CONANT — 1953 — Immunologic studies on the etiologic agents of North and South American blastomycosis. I. Comparison of hypersensitivity reactions. *Mycopathologia* 6: 310-316.

FRIEDMAN, L. & N. F. CONANT — 1953 — Immunologic studies on the etiologic agents of North and South American blastomycosis. II. Comparison of serologic reactions. *Mycopathologia* 6: 317-324.

FURCOLOW, M. L., M. E. EMGE & I. L. BUNNEL — 1948 — Depression of tuberculin and histoplasmin sensitivity associated with critical illness. *Pub. Health Rep.* 63: 1290.

FURCOLOW, M. L. & J. T. GRAYSTON — Non tuberculous chest diseases. Occurrence of histoplasmosis in epidemics. Transactions of the Forty-eight Annual Meeting of the National Tuberculosis Association, 1-9, 1952.

FURCOLOW, M. L., R. W. MENGES & H. W. LARSH — 1955 — An epidemic of histoplasmosis involving man and animals. *An. Int. Med.* 43: 173-181.

FURCOLOW, M. L. — 1956 — The clinical diagnosis of histoplasmosis. *Postgrad. Med.* 20: 349-364.

FURCOLOW, M. L. — 1958 — Recent studies on the epidemiology of histoplasmosis. *Ann. New York Acad. Sc.* 72: 127-164.

GOMES, J. M. & L. ASSUMPTÃO — 1924 — Em torno do género *Coccidioides*. *Ann. Paul. Med. Cir.* 15: 49-61.

GRAYSTON, J. T. — 1952 — A study of the complement fixation reaction in histoplasmosis. *J. Lab. Clin. Med.* 40: 90-101.

HARRIS, J. S. *et alii* — 1957 — North American blastomycosis in an epidemic area. *Pub. Health Rep.* 72: 95-100.

HASSID, W. Z., E. E. BAKER & R. M. MCCREADY — 1943 — An immunologically active polysaccharide produced by *Coccidioides immitis* Rixford and Gilchrist. *J. Biol. Chem.* 149: 303-311.

HAZEN, E. L. & E. D. TAHLER — Quantitative complement-fixation tests for evidence of histoplasmosis and blastomycosis. (*in An. Rep. Div. Lab. Res. Albany, N. Y., State Dept. Health, 1953, p. 73-4*).

HAZEN, E. L. & C. H. GREENE — Quantitative complement-fixation tests for evidence of histoplasmosis and blastomycosis. (*in An. Rep. Div. Lab. Res. Albany, N. Y., State Dept. Health, 1956, p. 97*).

HAZEN, E. L. & C. H. GREENE — Quantitative complement-fixation tests for evidence of histoplasmosis and blastomycosis. (*in* An. Rep. Div. Lab. Res. Albany, N. Y., State Dept. Health, 1957, p. 75).

HOUNIE, P. & R. G. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE — 1957 — Encuesta sobre la sensibilidad al agente de la blastomicosis sudamericana. An. Fac. Med. Montevideo 42: 27-32.

LABZOFFSKY, N. A., J. B. FISCHER & J. J. HAMVAS — 1957 — Studies on the antigenic structure of *Histoplasma capsulatum*. Canad. J. Microbiol. 3: 975-85.

LACAZ, C. S. — 1945 — Contribuição brasileira para o estudo da blastomicose sul-americana (granulomatose paracoccidióidica). Hospital (Rio), 28: 249-60.

LACAZ, C. S. — Contribuição para o estudo dos actinomicetos produtores de micetomas. Tese de livre-docência. São Paulo, Tip. Rossohillo, 1945.

LACAZ, C. S. — 1948 — Blastomicose sul-americana. Reações intradérmicas com paracoccidioidina, coccidioidina e blastomicetina. Rev. Hosp. Clin. 3: 11-18.

LACAZ, C. S. — 1949 — Novos dados em relação à blastomicose sul-americana e seu agente etiológico. Rev. Med. Cir. São Paulo 9: 303-41.

LACAZ, C. S. — 1951 — Lesões pulmonares na blastomicose sul-americana. Inquérito preliminar realizado com paracoccidioidina. Hospital (Rio) 39: 405-422.

LACAZ, C. S. *et alii* — 1955 — Histoplasose na infância. Comentários sobre um caso. Revisão da literatura nacional. Novos dados sobre a histoplasmina em nosso meio. Rev. Paulista Med. 47: 495-509.

LACAZ, C. S. — Manual de micologia médica. 2.^a ed. São Paulo, Irmãos Dupont, 1956.

LACAZ, C. S. *et alii* — Contribuição para o estudo da "blastomicose-infecção". Inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidino-positivos. Em publicação.

LEHAN, P. H. & M. L. FURCOLOW — 1957 — Epidemic histoplasmosis. J. Chron. Dis. 5: 489-503.

MACKINNON, J. E., R. C. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE & L. ARROYO — 1953 — Sobre la especificidad de la intradermorreaccion con paracoccidioidina. An. Fac. Med. Montevideo 38: 363-82.

MARTIN, D. S. — 1935 — Complement fixation in blastomycosis. J. Infect. Dis. 57: 291-5.

MARTIN, D. S., D. T. SMITH & N. C. DURHAN — 1936 — The laboratory diagnosis of blastomycosis. J. Lab. Clin. Med. 21: 1289-96.

MARTIN, D. S. & D. T. SMITH — 1939 — Blastomycosis (American blastomycosis, Gilchrist's disease). I. A review of the literature. Am. Rev. Tuberc. 39: 275-304.

MARTIN, D. S. & D. T. SMITH — 1939 — Blastomycosis (American blastomycosis, Gilchrist's disease). II. A report of thirteen new cases. Am. Rev. Tuberc. 39: 488-515.

MARTIN, D. S. — 1953 — Serologic studies on North American blastomycosis. Studies with soluble antigens from untreated and sonic-treated yeast-phase cells of *Blastomyces dermatitidis*. J. Immunol. 71: 192-201.

MOSES, A. — 1916 — Fixação do complemento na blastomicose. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 8: 68-70.

NORDÉN, A. — 1949 — Agglutination of sheep's erythrocytes sensitized with histoplasmin. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 70: 218-220.

NORDÉN, A. — 1951 — Sporotrichosis. Clinical and laboratory features and a serological study in experimental animals and humans. Acta Path. e Microb. Scandinav. (suppl.) 39.

PAPPAGIANIS, D. & G. S. KOBAYASHI — 1958 — Production of extracellular polysaccharide in cultures of *Coccidioides immitis*. Mycologia 50: 229-38.

PATES, A. L. — 1948 — Precipitin reactions in experimental histoplasmosis and blastomycosis. Science 108: 383-5.

PECK, R. L., D. S. MARTIN & C. R. HAUZER — 1940 — Polysaccharides of blastomyces dermatitidis. J. Immunol. 38: 449-55.

PRIOR, J. A. & S. SASLAW — 1952 — Effect of repeated histoplasmin skin tests on skin reactivity and collodion agglutination. Am. Rev. Tuberc. 66: 588-93.

RAPPORT, M. M. & L. GRAFF — 1957 — Immunochemical analysis based on complement fixation. Ann. New York Acad. Sc. 69: 608-32.

SALVIN, S. B. — 1947 — Complement fixation studies in experimental histoplasmosis. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 66: 342-45.

SALVIN, S. B. — 1949 — The serologic relationship of fungus antigens. J. Lab. Clin. Med. 34: 1096-1104.

SALVIN, S. B. — 1950 — Quantitative studies on the serologic relationship of fungi. J. Immunol. 65: 617-26.

SALVIN, S. B. & M. L. FURCOLOW — 1954 — Precipitins in human histoplasmosis. J. Lab. Clin. Med. 43: 259-74.

SALVIN, S. B. *et alii* — 1954 — Influence of repeated histoplasmin skin tests on precipitins and complement-fixing antibodies. J. Lab. Clin. Med. 44: 56-62.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1948 — A method for demonstrating antibodies in rabbit sera against histoplasmin by collodion agglutination technic. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 68: 559-62.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1948 — The use of yeast phase antigens in a complement fixation test for histoplasmosis. I. Preliminary results with rabbit sera. J. Lab. Clin. Med. 33: 811-18.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1949 — A collodion agglutination test for histoplasmosis. Public. Health Rep. 64: 424-9.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1950 — Serologic studies in histoplasmosis. Am. J. Public Health 40: 427-35.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1953 — Effect of histoplasmin skin testing on serologic results. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 82: 689-91.

SCHUBERT, J. *et alii* — 1953 — Variation in complement fixation antigen production by different strains of *Histoplasma capsulatum* grown on two media. J. Lab. Clin. Med. 41: 91-7.

SCHUBERT, J. H. & L. AJELLO — 1957 — Variation in complement fixation antigenicity of different yeast phase strains of *Histoplasma capsulatum*. J. Lab. Clin. Med. 50: 304-7.

SCHWARZ, J. & G. L. BAUM — 1952 — Results of skin tests in contact of blastomycotic patients. J. Invest. Derm. 18: 3-4.

SCHWARZ, J. & M. L. FURCOLOW — 1955 — Some epidemiologic factors and diagnostic tests in blastomycosis, coccidioidomycosis and histoplasmosis. Am. J. Clin. Path. 25: 261-5.

SILVA, N. N. — Intradermo-reação para diagnóstico da blastomicose de Lutz. Segunda Reunião Anual dos Dermato-sifilógrafos Brasileiros, 13/14, 1945.

SMITH, C. E. — 1943 — Coccidioidomycosis. Med. Clin. North America 27: 790-807.

SMITH, C. E. *et alii* — 1948 — The use of coccidioidin. Am. Rev. Tuberc. 57: 330-60.

SMITH, C. E. *et alii* — 1949 — Histoplasmin sensitivity and coccidioidal infection. I. Occurrence of cross-reactions. Am. J. Pub. Health 39: 722-36.

SMITH, C. E. *et alii* — 1950 — Serological tests in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. Am. J. Hyg. 52: 1-21.

SMITH, D. T. — 1949 — Immunologic types of blastomycosis. A report on 40 cases. Ann. Int. Med. 31: 463-9.

SORENSEN, L. J. & E. E. EVANS — 1954 — Antigenic fractions specific for *Histoplasma capsulatum* in the complement fixation reaction. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87: 339-41.

STEIN, G. J. & D. VAN NGU — 1950 — A quantitative complement fixation test: titration of luetic sera by unit of 50 per cent hemolysis. J. Immunol. 65: 17-37.

STEWART, R. A. — Coccidioidomycosis. (in R. D. G. Simons, Medical Mycology, Amsterdam, Elsevier Publishing Co., 1954).

WADSWORTH, A. B. — Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947.

WILSON, J. W., C. E. SMITH & O. A. PLUMKETT — 1953 — Primary cutaneous coccidioidomycosis. The criteria for diagnosis and report of a case. California Med. 79: 233-9.

WILSON *et alii* — 1955 — Primary cutaneous North American blastomycosis. A. M. A. Arch. Dermat. 71: 39-45.

WILSON, J. W. — Clinic and immunologic aspects of fungous diseases. Springfield, Mass, C. C. Thomas, 1957.