

PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *P. BRASILIENSIS* POR IMUNODIFUSÃO RADIAL (IMUNOPLACAS)

E. PORTO (1), R. G. FERRI (2) e I. IRULEGUI (3)

RESUMO

Os Autores relatam os resultados do estudo comparativo, realizado com soros de 88 portadores de paracoccidioidomicose, entre os métodos de imunodifusão de Ouchterlony (ID) e de imunodifusão radial de Mancini (IDR). Para a última foram utilizadas placas de gel de ágar contendo o antígeno (extraído de culturas de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme) e aplicados em orifícios os soros dos pacientes. Os halos circulares de precipitação indicam a presença de anticorpos contra o *P. brasiliensis*. IDR mostrou-se mais sensível que ID, pois 17 amostras em que os anticorpos não foram revelados por ID formaram halos de precipitação por IDR.

INTRODUÇÃO

Em estudo comparativo entre a imunodifusão em gel de ágar (ID) de OUCHTERLONY⁴ e a reação de fixação do complemento (RFC) para diagnóstico da paracoccidioidomicose, RESTREPO⁵ demonstrou ser a primeira de grande valor não só por sua simplicidade e rapidez na execução, mas também, por sua grande sensibilidade. Posteriormente, RESTREPO & MONCADA⁶ compararam as mesmas técnicas utilizando antígeno preparado a partir da mistura de culturas de três amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* na fase leveduriforme, isoladas de pacientes diferentes.

Os pacientes foram acompanhados sorologicamente por um, dois, três e, em alguns casos, até quatro anos de tratamento. Concluíram que, na detecção de anticorpos, a ID é mais sensível que a RFC e observaram que, na maioria dos casos (mais de 70%), os anticorpos precipitantes persistiram por alguns anos durante o tratamento.

Estes mesmos Autores⁷ fizeram, por ID, a semiquantificação dos anticorpos para o *P. brasiliensis*, utilizando diluições seriadas dos soros dos pacientes.

O resultado negativo da ID, em algumas amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose, pode ser atribuído à proporção inadequada das concentrações relativas de antígeno e anticorpo. Isto exigiria, além da execução da prova com diluições seriadas das amostras (com as quais se obteve resultado negativo com o soro não diluído), a execução, também com diluições seriadas do antígeno. Entretanto, se ao invés de se fazer a difusão do antígeno contra o anticorpo como é feito nesta técnica, o antígeno for incorporado ao ágar e se deixar a amostra de soro difundir neste (MANCINI & col.³), haverá difusão dos anticorpos até que seja atingida a proporção ótima das concentrações de antígeno e anticorpo. Formar-se-á halo de precipitação, cujo diâmetro, elevado ao quadrado (D^2), será proporcional à concentração de anticorpos no soro, desde que se fixe a concentração de anti-

Trabalho realizado no Centro de Pesquisas Imunoquímicas e no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

(1) Médico Veterinário do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — USP

(2) Professor Livre-Docente do Instituto de Ciências Biomédicas — Departamento de Microbiologia e Imunologia — USP

(3) Professor Assistente Doutor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — USP

geno distribuído uniformemente no gel. Este método, sabidamente, se aplica à quantificação de antígeno ou de anticorpos, desde que se tenha constante um destes elementos; é conhecido como Imunodifusão Radial de MANCINI & col.³ (IDR).

Os Autores, utilizando amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose, apresentam estudo comparativo entre a sensibilidade das técnicas de ID e de IDR na detecção de anticorpos precipitantes específicos para o *P. brasiliensis*, sem a preocupação de quantificação destes.

MATERIAL E MÉTODOS

1) **Antígeno** — Tanto para os experimentos de ID como para IDR foi utilizada preparação feita por Restrepo & Moncada a partir de três amostras de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme (RESTREPO & MONCADA⁶).

2) **Amostras de soro** — Foram utilizadas 88 amostras de soro de portadores de paracoccidiodomicose diagnosticada através de exame direto ao microscópio ou por biopsia ou ainda por ID, sendo utilizados sempre dois destes métodos em associação ao quadro clínico. A preservação dos soros foi feita a -20°C utilizando-se também mertiolato à concentração final de 1:10 000.

3) **Imunodifusão de OUCHTERLONY**⁴ — As lâminas (25 x 75 mm) foram previamente revestidas com solução de ágar a 1% em água destilada que, após secagem, forma uma cutícula para isolar o vidro do gel a ser adicionado posteriormente. Bacto ágar (Difco) a 1% em NaCl 0,15 M foi distribuído usando-se três ml por lâmina. As amostras de soro foram colocadas em orifícios praticados no gel, com diâmetro de três mm e distantes cinco mm do orifício central contendo o antígeno. A difusão foi deixada prosseguir, fazendo-se leituras 24 e 48 horas após aplicação.

4) **Imunodifusão Radial de MANCINI & col.**³ — O antígeno foi diluído seis vezes em NaCl 0,15 M e esta solução misturada a igual volume de ágar a 2% em NaCl 0,15 M contendo azida sódica a 1/1000 como preservativo. Lâminas de vidro (50 x 75 mm ou 25 x 75 mm) também previamente revestidas como descrito para ID, foram cobertas com seis ou três ml do gel contendo o antígeno, respectivamente.

O soro dos pacientes foi aplicado em orifícios de 3,5 mm de diâmetro, distantes nove mm um do outro. Após comparação entre as diluições finais do antígeno de três, seis e 12 vezes verificou-se que a melhor diluição, para a partida de antígeno utilizada, foi a última.

A difusão foi deixada prosseguir até o maior crescimento do halo de precipitação, o que se verifica no mínimo em 72 horas, em câmara úmida a temperatura ambiente. O gel foi então coberto com solução aquosa a 4% (pH 1,5) de ácido tânico para intensificar os halos de precipitação, permitindo maior facilidade de mensuração. Após dois minutos o gel foi cuidadosamente lavado em água corrente durante alguns minutos. No máximo em 30 minutos a leitura dos diâmetros dos halos era feita com auxílio do imunoscópio de projeção(*). Este aparelho amplia a imagem de 5,2 vezes e possui uma régua graduada que se desloca sobre a tela de projeção, o que permite uma medida bastante exata dos diâmetros das áreas circulares de precipitação.

Muitas das amostras foram submetidas à IDR em duplicata, corando-se uma delas com solução de negro de amido 10B, Merck, (0,4 g/100 ml) em solução aquosa de ácido acético a 10%, após lavagem das lâminas com solução 0,15 M de NaCl para remoção do excesso de reagentes, e secagem do ágar. Como não fossem observadas diferenças expressivas entre as leituras sem qualquer tratamento ou após adição de ácido tânico ou ainda pela coloração com negro de amido, optamos pela intensificação dos halos por ácido tânico, em virtude de sua simplicidade.

RESULTADOS

Os anticorpos, difundindo radialmente no gel contendo o antígeno preparado a partir de culturas de *P. brasiliensis* (fase leveduriforme), formaram halos de precipitação. A Fig. 1 ilustra o aspecto desses halos, ao lado de amostras postas em orifícios em torno dos quais não houve precipitação. Na mesma figura pode-se verificar a presença de um ou mais halos adicionais, formados por algumas amostras.

(*) Montado nos laboratórios da «Karl Zeiss Companhia Óptica e Mecânica» segundo recomendações técnicas de R. G. Ferri.

T A B E L A I

Resultados das provas de Ouchterlony e imunodifusão radial de Mancini para amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose

Nº de identificação do soro	Resultado da ID	Imunodifusão Radial:diâmetro dos halos (mm x 5,2) obtidos com 15µl de amostra	Nº de identificação do soro	Resultado da ID	Imunodifusão Radial:diâmetro dos halos (mm x 5,2) obtidos com 15µl de amostra
1	-	-	50	+ (*)	35,0
2	-	26,0	51	+	35,5
3	-	-	52	+ (**)	33,5
4	-	30,5	53	+ (*)	32,5
5	-	30,0	54	+	34,0
6	-	-	55	+	28,0 (****)
7	-	21,5	56	+	30,0
8	-	28,5	57	+ (*)	32,0
9	-	-	58	+	28,0
10	-	-	59	+	29,5
11	-	36,5	60	+	30,0
12	-	35,0	61	+	29,5
13	-	36,0	62	+ (*)	30,0
14	-	34,0	63	+	28,0
15	-	49,5	64	+	26,0
16	+	33,5	65	+	30,0
17	+	31,5	66	+	22,5
18	+	27,5	67	+	25,0
19	+	26,5	68	+	52,0
20	+	29,0	69	+	-
21	-	32,0	70	+	39,5
22	-	30,0	71	+	-
23	-	-	72	+	29,0
24	-	-	73	+	38,0 (****)
25	-	-	74	+	27,5
26	-	-	75	+	31,5
27	-	-	76	+	30,0
28	-	26,0	77	+	24,5
29	-	-	78	+	30,0
30	-	-	79	+	25,5
31	-	30,0	80	+	28,0
32	-	28,5	81	+	29,5
33	-	32,5	82	+	30,0
34	-	31,0	83	+	29,0
35	-	-	84	+	25,0
36	-	-	85	+	32,0
37	+	30,0	86	+	21,5
38	+	35,5	87	+	32,0
39	+ (*)	28,0 (***)	88	+	32,0 (****)
40	+	32,0			
41	+	28,5			
42	+	36,5			
43	+	27,0			
44	+	29,0			
45	+	30,5			
46	+ (*)	25,0			
47	+	22,0			
48	+ (*)	-			
49	+	41,5			

(*) Amostras que apresentam duas linhas de precipitação

(**) Amostras que apresentam três linhas de precipitação

(***) Amostras que, além do halo cujo diâmetro está indicado, apresentam mais um halo interno a este.

(****) Amostras que além do halo cujo diâmetro está indicado, apresentam mais dois halos internos a este.

(+) Positivo

(-) Negativo

A Tabela I resume os resultados obtidos por ID e IDR, nas 88 amostras de soros estudadas, estando também indicadas as amostras que formaram mais de um halo ou linha de precipitação por IDR e ID respectivamente.

Halos de precipitação foram obtidos por IDR em 71 das 88 amostras (80,7%) e linhas de precipitação por ID foram observadas em 57 (64,8%) das mesmas 88 amostras. O total de 71 positivos por IDR representa a soma de

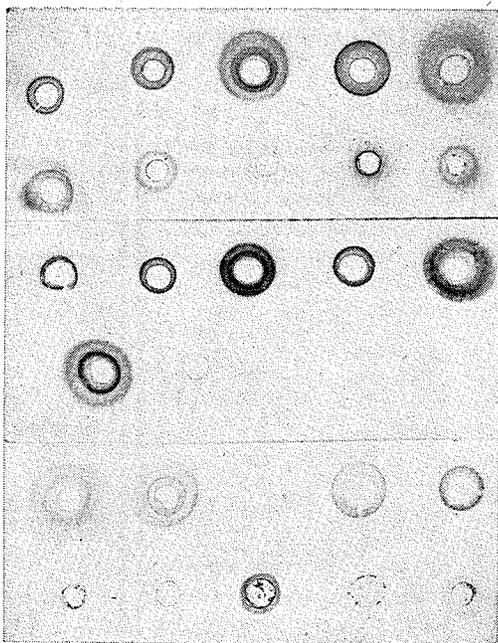


Fig. 1 — Imunodifusão radial (IDR) de soros de pacientes com paracoccidiodomicose (orifícios) em gel de ágar contendo o antígeno de *P. brasiliensis*. Os halos representam o precipitado antígeno-anticorpo. Ausência de halos significa inexistência de anticorpos ou nível inadequado para a reação. Observar presença de mais de um halo em algumas amostras.

TABELA I

Comparação dos resultados obtidos através das provas de IDR em amostras de soros de pacientes (88) com paracoccidiodomicose

Resultados	Nº de soros	Percentual (%)
ID e IDR positivos	54	61,4
ID negativos e IDR positivos	17	19,3
ID e IDR negativos	14	15,9
ID positivos e IDR negativos	3	3,4
Total	88	100,0

54 positivos, simultaneamente por IDR e ID, e mais 17 que, não tendo formado linhas por ID deram fortes halos de precipitação por IDR (Tabela II). Houve também três amostras que deram reação de ID positiva e não formaram halos por IDR, quando os 15 microlitros de soro foram aplicados; no entanto, aplicando-se somente oito microlitros no orifício de difusão (IDR) houve aparecimento de halo.

DISCUSSÃO

Em sua série de estudos sobre a aplicação de ID ao diagnóstico da paracoccidiodomicose, RESTREPO⁵ e RESTREPO & MONCADA^{6, 7,8} demonstraram a grande utilidade desta técnica devido a sua maior simplicidade e sensibilidade que a RFC.

Esta técnica também possibilita semiquantificação dos anticorpos.

Obtiveram esses Autores 95% de positividade por ID⁶, utilizando antígeno preparado a partir de culturas na fase leveduriforme do *P. brasiliensis*. Demonstraram ainda a persistência de anticorpos precipitantes em soros de pacientes que estavam sob tratamento pelo período de três a quatro anos durante os quais foram observados, o que, no dizer desses Autores, “é diferente do que FAVA NETO¹ e FAVA NETTO & col.² encontraram pela técnica de precipitação em tubo” quando observaram que “precipitinas eram os primeiros anticorpos a aparecer no sangue e também os primeiros a não serem detectados durante um tratamento bem sucedido”. Os mesmos Autores destacam, entretanto, a importância da RFC pelo fato de “sua natureza quantitativa ter correlação com a condição clínica do paciente e com sua resposta ao tratamento”. Esses mesmos Autores, utilizando diluições seriadas de soro de pacientes com paracoccidiodomicose⁷, fizeram o seguimento do nível de anticorpos precipitantes durante 36 meses de tratamento, bem como dos anticorpos fixadores de complemento, tendo observado que os títulos fornecidos pela RFC eram consistentemente mais altos que os obtidos por ID.

A verificação da persistência dos anticorpos precipitantes e sua conseqüente importância no diagnóstico, aliada à facilidade de execução, grande sensibilidade, e possibilidade de quantificação pela técnica de IDR de MANCINI & col.³, motivaram os presentes Autores a tentar a aplicação desta técnica à detecção de anticorpos específicos precipitantes. A possibilidade de quantificação sem a necessidade da diluição sucessiva dos soros, por esta técnica, permite a verificação do nível de anticorpos, em grande número de soros simultaneamente, com grande economia de reagentes e de tempo.

A quantificação de anticorpos precipitantes deverá ser feita frente a soro padrão (con-

servado a -20°C) tomado como referência. Devem ser utilizadas três diferentes diluições do padrão para a elaboração de uma curva de referência (como na quantificação de imunoglobulinas). Utilizando, sempre, antígenos padronizados os resultados serão semiquantitativos, como nas reações sorológicas usuais.

No presente trabalho, entretanto, os Autores não tiveram a preocupação de quantificar os anticorpos, mas sim de comparar a sensibilidade da IDR com a da ID, utilizando para isto o mesmo antígeno. Observaram que 17 amostras com positividade por IDR, foram não reativas na ID, o contrário acontecendo com três das amostras. Estas últimas, como já mencionado, formaram halo de precipitação na IDR, quando foram utilizados oito ao invés de 15 microlitros de soro. Este fato deve ser explicado pela necessidade da existência de proporção adequada entre as concentrações do antígeno e do anticorpo, para maior sensibilidade, e mostra a necessidade da realização da IDR com diferentes volumes de amostra, nos casos em que o primeiro resultado seja negativo.

A formação de menor número de halos (IDR), quando obtemos três linhas (ID) de precipitação, e vice-versa, também se explica pelas diferentes relações antígeno-anticorpo, quando os dois métodos são praticados com a mesma amostra.

Nossos resultados de positividade para IDR (80,7%) e ID (64,8%), quando comparados aos de RESTREPO & MONCADA⁶ (95,0%) obtidos por imunodifusão de OUCHTERLONY⁴ (ID) encontram explicação no fato de que o antígeno enviado pela Dra. Restrepo já havia sido preparado havia mais de um ano, e ainda de que, alguns soros sofreram congelamentos e descongelamentos sucessivos antes da realização das provas. Este fato carece de maior importância, pois nosso propósito, de demonstrar maior sensibilidade da imunodifusão radial de MANCINI & col.³ em comparação com a imunodifusão de OUCHTERLONY⁴, foi plenamente atingido.

S U M M A R Y

Detection of antibodies against *P. brasiliensis* by radial immunodiffusion (immunoplates)

The present paper reports the results obtained by comparing the conventional Ouch-

terlony's immunodiffusion (ID) and the radial immunodiffusion devised by Mancini-Carbonara-Heremans (RID) done in the reverse way. This means that the plates contained the antigen incorporated into the agar-gel (antigen extracted from *P. brasiliensis* cultures in the yeast phase), and the wells were filled with the serum samples. The precipitation rings formed around the holes are an evidence for the presence of specific antibodies to *P. brasiliensis*.

Reverse radial immunodiffusion (RID) revealed a better sensitivity than ID, since 17 serum samples, in which the antibodies were not revealed by ID, presented clearly visible rings by RID.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.* 18: 197-254, 1955.
2. FAVA NETTO, C.; FERRI, R. G. & LACAZ, C. da S. — Proteinograma e algumas «provas da fase aguda do soro» na blastomicose sul-americana; estudo comparativo com as reações de fixação do complemento e de precipitação. *Med. Cir. Farm.* 277: 157-163, 1959.
3. MANCINI, G.; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. — Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-254, 1965.
4. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 26: 507-515, 1949.
5. RESTREPO, M. A. — La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia* 4: 223-230, 1966.
6. RESTREPO, M. A. & MONCADA, L. H. — Serologic procedures in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Proc. Int. Symp. Mycoses. PAHO Sci. Publ.* 205: 101-110, 1970.
7. RESTREPO, M. A. & MONCADA, L. H. — Indirect fluorescent antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl. Microbiol.* 24: 132-137, 1972.
8. RESTREPO, M. A. & MONCADA, L. H. — Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Appl. Microbiol.* 28: 138-144, 1974.