

IMUNEGLOBULINAS ESPECÍFICAS (IgA, IgG e IgM) EM SOROS DE CHAGÁSICOS CRÔNICOS VERIFICADAS POR REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Maria Anita Cambiaghi MAGNANI (1), Francisco FERRIOLLI Filho (2)
e Astolpho Ferraz de SIQUEIRA (3)

RESUMO

Com reações de imunofluorescência indireta usando antiglobulinas humanas marcadas das classes IgA, IgG e IgM, os Autores pesquisaram a presença de anticorpos específicos no soro de chagásicos crônicos. Dos 71 soros testados 31 pertenciam a doentes em que se fez a comprovação parasitológica por hemocultura. Anticorpo da classe IgG foi encontrado em todos os soros testados. Em relação a IgA a reação foi positiva em 64 dos 71 examinados (90,1%) e para IgM houve 68 reações positivas (95,8%). Os Autores chamam atenção para a existência de anticorpos específicos da classe IgM na fase crônica da doença de Chagas e discutem a importância desse achado.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de imunoglobulinas específicas no soro de portadores de moléstias parasitárias tem despertado a atenção dos pesquisadores não só por oferecer oportunidade de um conhecimento melhor dos mecanismos imunitários envolvidos, como pela possibilidade de se fazer um diagnóstico mais preciso das mesmas. Entre as moléstias parasitárias a verificação de aumento de IgM em portadores de tripanossomose africana é o exemplo mais típico.

Em relação à doença de Chagas as pesquisas feitas por quantitação mostraram que não ocorria fenômeno idêntico ao da tripanossomose africana, isto é, IgM não se mostrava elevada. É preciso levar em conta porém, que a variação dentro das amostras populacionais é relativamente grande, e só aumentos de concentração muito elevados podem ser evidenciados. A maneira de se evitar esse

inconveniente é a realização de imunofluorescência utilizando anticorpos marcados contra as diversas imunoglobulinas. Foi assim que LEHLCHUC & col.⁶ conseguiram demonstrar a presença de anticorpos contra *T. cruzi* das classes IgA e IgG no soro de chagásicos crônicos.

No presente trabalho relatamos os resultados que obtivemos pesquisando anticorpos específicos das classes IgA, IgG e IgM em soros de chagásicos crônicos usando a reação de imunofluorescência indireta.

MATERIAL E MÉTODOS

A — Soros ensaiados

Soros de 71 chagásicos crônicos revelados por reação de fixação de complemento posi-

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

(1) Acadêmica de Medicina. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(2) Assistente Doutor
(3) Professor Adjunto

tiva, técnica de FREITAS & ALMEIDA⁴, todos adultos, procedentes de região onde a doença de Chagas é endêmica. Os soros foram coletados e ampolados à medida em que eram encaminhados ao laboratório e então conservados em congelador a -20°C até momentos antes de serem feitas as reações. Trinta e um desses pacientes foram examinados por hemocultura pela técnica de ALBUQUERQUE & col.¹ sendo em todos eles comprovado o parasitismo pelo *Trypanosoma cruzi*.

B — *Imunofluorescência indireta para pesquisa de IgA, IgG e IgM*

Como antígeno usamos *Trypanosoma cruzi* cultivado em meio líquido fornecido liofilizado pelo Wellcome Reagents Limited. As lâminas, com áreas de reação delimitadas com Polifluortetraetileno, foram preparadas momentos antes da reação e os tripanossomos fixados por metanol durante 10 minutos. As antiglobulinas específicas (IgA, IgG e IgM) marcadas com fluoresceína foram também fornecidas pela Wellcome Reagents Limited. As anti IgA e IgM foram usadas diluídas a 1/10. A anti IgG o foi a 1/20.

Como nas reações convencionais usamos uma técnica indireta e observamos os seguintes tempos: a) 30 minutos para incubação dos soros a 37°C; b) 30 minutos de lavagem em PBS pH 7,2 com trocas a cada 10 minutos; c) 30 minutos de incubação com antiglobulina marcada, em estufa a 37°C; d) 60 minutos de lavagem em PBS pH 7,2 com trocas de líquido a cada 15 minutos. Para as reações de pesquisa de IgG a diluição inicial dos soros foi 1/50; para pesquisa de IgA e IgM foi de 1/10. Para leitura usamos um fotomicroscópio Zeiss com lâmpada a vapor de mercúrio HBO 200 W1, filtro de excitação BG 12 e de barragem 50, condensador em campo escuro.

Em todas as vezes que fizemos as reações, introduzimos um soro sabidamente negativo para controle.

RESULTADOS

Os resultados por nós obtidos encontram-se resumidos no Quadro I.

QUADRO I

Resultados da determinação dos níveis de IgA, IgG e IgM em 71 soros de chagásicos crônicos

Soros	Imunoglobulinas		
	IgA	IgG	IgM
reagentes até 1/10	11	0	7
reagentes até 1/50	25	0	23
reagentes até 1/100	27	3	36
reagentes até 1/500	1	7	2
reagentes até 1/1000	0	20	0
reagentes até 1/3000	0	23	0
reagentes até 1/6000	0	16	0
reagentes até 1/12000	0	2	0
não reagentes	7	0	3

A pesquisa de anticorpos da classe IgA, anti *Trypanosoma cruzi* foi positiva em 64 dos 71 soros ensaiados, isto é, 90,1% de positividade. Em relação a IgM tivemos 68 reações positivas, ou seja, em 95,8% dos estudados encontramos essa classe de imunoglobulina reagindo contra o *T. cruzi*.

Os testes feitos com IgG foram positivos em todos os casos e sempre em diluições mais altas que as observadas com IgA ou IgM. Em um dos soros estudados ocorreu reação positiva só com IgG; em 7 houve positividade em ao menos duas das 3 reações executadas e 63 foram positivos nas três.

DISCUSSÃO

A cronificação da Doença de Chagas indica a existência de uma defesa imunológica suficiente para controlar e impedir a multiplicação em ritmo progressivo dos parasitos. A comprovação da existência de tripanossomos circulantes em todos os chagásicos pesquisados (ALBUQUERQUE & col.¹) permite supor a ocorrência constante de estímulos antigênicos e, naturalmente, liberação de anticorpos específicos. KORTSARZ & col.⁵ foram

os primeiros a comprovar elevação de gama-globulina em chagásicos crônicos. O segundo passo seria a distinção entre as classes de imunoglobulinas conhecidas. MARSDEN & col.⁷ conseguiram demonstrar ligeira elevação de IgG em chagásicos crônicos. A demora verificada nesse sentido deve ter ocorrido provavelmente por dificuldade do método habitualmente utilizado (imunodifusão radial) em detectar variações não muito acentuadas que é o que normalmente deve ocorrer entre os chagásicos. Reações sorológicas feitas em soros fracionados e, especialmente a imunofluorescência com antglobulinas específicas marcadas, permitiram a LEHLCHUC & col.⁶ comprovar a existência de anticorpos dos tipos IgG e IgA na maioria dos chagásicos crônicos e IgM em alguns deles.

A presença de anticorpos específicos das 3 classes principais de imunoglobulinas ocorreu em quase todos os soros pesquisados por nós. Não nos surpreenderam os achados relativos a IgG e IgA pois apenas vieram confirmar os dados de LEHLCHUC & col.⁶. Entretanto a observação da existência de anticorpos da classe IgM em 68 dos 71 soros de chagásicos crônicos estudados foi um resultado importante. Nos dados de LEHLCHUC & col.⁶ vemos que em 2 dos onze casos crônicos estudados a reação foi positiva na fração I que é predominantemente IgM. Parece que os Autores não se preocuparam em fazer o teste com anti IgM marcado como fizeram em relação a IgA e IgG e, provavelmente por isso, não encontraram maior número de positivos. Se considerarmos que nas reações de imunofluorescência IgM pode sofrer competição por IgG com desvantagem para a primeira, como demonstraram COHEN & col.³, devemos assumir como corretas as reações positivas, havendo ainda a possibilidade de que, entre as poucas negativas pode ter havido inibição por IgG e não ausência de IgM. Dessa forma nossos resultados indicam a presença quase constante de imunoglobulina da classe IgM no soro de portadores da doença de Chagas em fase crônica. De acordo com BROWN² e OGILVIE⁵ a explicação para alto teor de IgM no soro de portadores de *Trypanosoma rhodesiense* seria a constante variação antigênica de superfície apresentada por esse protozoário. No caso do *T. cruzi* variações antigênicas dessa natureza são desconhecidas e assim

sendo, a presença de IgM na fase crônica não deveria ocorrer. Todavia, frente aos resultados obtidos, somos propensos a acreditar na possibilidade de existência de variações de antígenos de superfície também no *Trypanosoma cruzi*. Aliás em trabalho recente, SIQUEIRA & col.⁹ estudando as relações antigênicas de tripanosomas colhidos em épocas diferentes de uma mesma infecção, mostraram que estes tripanosomas sofrem modificações cíclicas que foram verificadas pelo seu comportamento nas reações de aglutinação e também em reações diretas de imunofluorescência. Estes Autores também sugerem a existência de uma variação antigênica nas infecções pelo *T. cruzi*.

Quanto às concentrações de imunoglobulinas específicas anti-*T. cruzi*, presentes no soro de chagásicos crônicos confirmamos que IgG é a classe que aparece constantemente e sempre em níveis mais elevados que IgA e IgM.

SUMMARY

Specific immunoglobulin levels (IgA, IgG and IgM) in chronic chagasic patients

Indirect immunofluorescent technique was used for detection of specific immunoglobulins (IgA, IgG and IgM) directed to *Trypanosoma cruzi* in the sera of 71 chronic chagasic patients. IgG was detected in all sera examined and in higher levels than IgA or IgM antibodies. The results obtained for IgA were 90.1% and for IgM were 95.8%. The presence of antibodies of the IgM class in chronic stage of Chagas Disease is emphasized.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, R. D. R.; FERNANDES, L. A. R.; FUNAYAMA, G. K.; FERRIOLLI F.º, F. & SIQUEIRA, A. F. — Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:1-5, 1972.
2. BROWN, K. N. — Immunologic aspects of parasitic infection. *Pan American Health Organization — Scient. Publ.* n.º 150, 1967.
3. COHEN, I. R.; NORINS, L. C. & JULIAN, A. J. — Competition between and effectiveness of IgG and IgM antibodies in indirect fluorescent antibody and other tests. *J. Immunol.* 98:143-149, 1967.

MAGNANI, M. A. C.; FERRIOLLI Filho, F. & SIQUEIRA, A. F. de — Imunoglobulinas específicas (IgA, IgG e IgM) em soros de chagásicos crônicos verificadas por reações de imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:72-75, 1973.

4. FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação de complemento para moléstia de Chagas. (Reação quantitativa com antígenos gelificados de culturas de *Trypanosoma cruzi*). *Hospital (Rio)* 35: 787-800, 1949.
5. KORTSARZ, F.; STRIZIC, N. A. & CASTILLO, E. B. — Electroforesis de las proteínas suéricas en la miocarditis crónica chagásica. *Medicina* 25:299-301, 1965.
6. LEHLCHUC, R.; DALMASSO, A. P.; INGLE-SINI, C. L.; ALVAREZ, M. & CERISOLA, J. A. — Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas' Disease). *Clin. Exp. Immunol.* 6: 547-555, 1970.
7. MARSDEN, P. D.; SEAH, S. K. K.; MOTT, K. E.; PRATA, A. & PLATT, H. — Immunoglobulins in Chagas' Disease. *J. Trop. Med. Hyg.* 73:157-161, 1970.
8. OGILVIE, B. M. — Immunoglobulin responses in parasitic infection. *J. Parasit.* 56 (Sec. II):525-534, 1970.
9. SIQUEIRA, A. F.; RIBEIRO, R. D. & FERNANDES, L. A. R. — Reações de aglutinação e as relações antigênicas de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:76-80, 1973.

Recebido para publicação em 15/7/1972.