

## REAÇÃO DE MICROIMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Maria Isabel Correa da SILVA, Luiz Gastão CHAMMA & Marcello FRANCO

---

### RESUMO

Utilizou-se técnica de microimunodifusão dupla em gel de ágar para a medida quali e quantitativa de anticorpos circulantes anti — *P. brasiliensis*, comparando-se os resultados com o macrométodo. Todos os 103 soros de pacientes portadores de paracoccidioidomicose foram positivos no micrométodo contra 87% de positividade no macrométodo. Os 83 soros de pacientes sem paracoccidioidomicose foram negativos em ambas as reações. Os títulos dos soros positivos tenderam a ser mais elevados no micrométodo, que forneceu bandas de precipitação mais nítidas e fáceis de serem lidas. O micrométodo é de realização simples, utiliza pequena quantidade de material e possibilita o teste simultâneo de 102 soros. Acreditamos que ele poderá substituir o macrométodo, especialmente em laboratórios de grande rotina sorológica.

**UNITERMOS:** Paracoccidioidomicose; Microimunodifusão.

---

### INTRODUÇÃO

**Paracoccidioides brasiliensis**, o agente etiológico da paracoccidioidomicose, possui numerosos antígenos, que induzem resposta imune humoral e celular. A medida desta resposta é útil no diagnóstico e seguimento dos pacientes. Entre os testes sorodiagnósticos, a macroimunodifusão dupla em gel de ágar tem se mostrado método específico e sensível, não necessitando para sua realização de nenhum equipamento especial ou reagentes caros<sup>3</sup>.

A reação de microimunodifusão foi descrita inicialmente por BUSEY & HINTON<sup>1</sup>, tendo sido posteriormente adaptada para outras micoses, como aspergilose, blastomicose norte-americana e coccidioidomicose<sup>3</sup>. Os resultados indi-

cam que o método é simples, específico e sensível, sendo muito útil em laboratórios que trabalham com numerosos soros.

O presente trabalho visou comparar as reações de imunodifusão em gel de ágar pelo macro e micrométodo na detecção e quantificação de anticorpos anti-*P. brasiliensis* na paracoccidioidomicose.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Soros** — Foram testados 103 soros de pacientes portadores de paracoccidioidomicose, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O diagnóstico

---

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina — UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Dr. Marcello Franco, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, CEP 18610 Botucatu, São Paulo, Brasil.

de todos os pacientes foi confirmado por exame micológico direto e/ou histopatológico. Como controle, foram testados 83 soros de pacientes do mesmo hospital, nos quais o diagnóstico de micose profunda foi afastado sob o ponto de vista clínico e laboratorial. Os soros foram testados não diluídos (reação qualitativa) e diluídos em solução salina em diluições múltiplas de 2 (reação quantitativa).

**Antígeno** — Utilizou-se antígeno de *P. brasiliensis* obtido por sonicação de formas leveduriformes do fungo (isolados 18, 113, 256), segundo técnica de PERAÇOLI et al<sup>6</sup>. A concentração de proteínas, determinada pelo método de LOWRY et al.<sup>4</sup>, foi de 7 mg/ml.

**Microimunodifusão** — o teste de microimunodifusão dupla em gel de ágar foi realizado segundo o proposto pelo Centers for Disease Control, Atlanta, USA<sup>3,7</sup>.

**Preparação das placas** — Um total de 10 ml de ágar preparado segundo o proposto pela Organização Mundial de Saúde para testes de imunodifusão<sup>2</sup> (agar-agar (Merck) 1 g; azida sódica 0.1 g; cloreto de sódio 0.85 g; solução tampão 1 ml (M/15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80.8 ml; M/15 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 19.2 ml); água destilada 99 ml) foi usado para cada placa de petri de poliestireno (100 x 15 mm). Inicialmente, um volume de 6.5 ml do ágar a 60-65°C foi pipetado na placa, distribuído e deixado gelar em superfície plana, à temperatura ambiente, por 30 min. A seguir, 3.5 ml do ágar a 95-98°C foram pipetados em um lado da camada de ágar nas placas e distribuídos homogeneamente com a matriz de plástico com os orifícios, como demonstrado na Fig. 1. As placas foram deixadas por 30 min à temperatura ambiente para solidificação do ágar. Após, removeu-se, com espátula, o ágar que preenchia cada orifício.

**Técnica do Teste** — Inicialmente os soros e a seguir o antígeno foram micropipetados (15 µl) nos orifícios, conforme demonstrado na fig. 2. Cada placa foi incubada por 48 h à temperatura ambiente (25°C), em câmara úmida. No final, a matriz foi retirada, a placa lavada com cuidado com água destilada. A leitura das bandas (presença e número) foi feita sobre luz branca indireta.

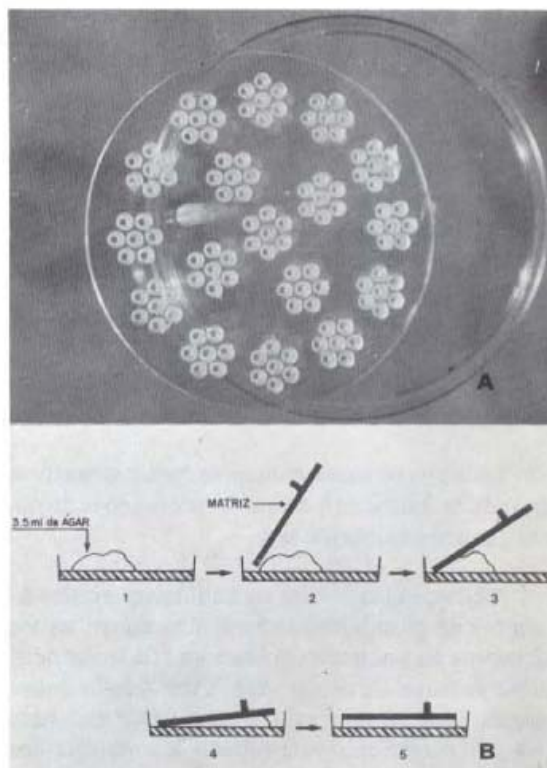


Fig. 1 — A. Matriz de acrílico de 1/8", com esquema de orifícios 17.7. B. Técnica da colocação da matriz na placa de petri, notar que a camada de ágar de 3.5 ml, onde ocorrerá a reação antígeno anticorpo, se dispõe homogeneamente entre a matriz e a camada de ágar no fundo da placa (modificado de STAN-DARD et al<sup>3</sup>).

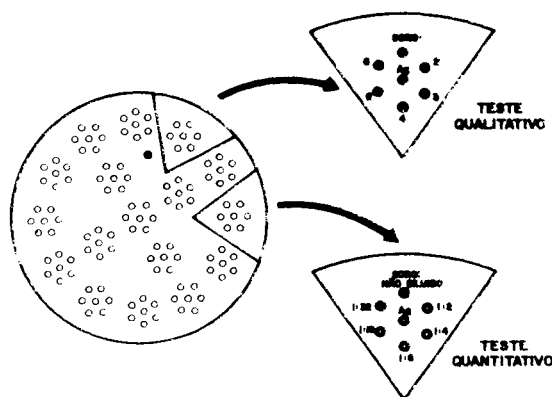


Fig. 2 — Esquema dos testes qualitativos (6 soros não diluídos por área) e dos testes quantitativos (1 soro por área; diluição até 1:32).

**Macroimunodifusão** — realizada segundo técnica usada na rotina sorodiagnóstica de paracocci-

diodomicose em nosso laboratório, como previamente descrita<sup>5</sup>.

## RESULTADOS

Todos os 103 soros de pacientes portadores de paracoccidiodomicose foram positivos na reação qualitativa de microimunodifusão. Setenta e nove soros deram uma banda (77%), 22 duas bandas (21%) e 2 soros três bandas (2%). A análise qualitativa dos mesmos soros na reação de macroimunodifusão revelou positividade em 90 soros (87%). Destes, 76% mostraram uma banda e 24% duas bandas.

Todos os 83 soros controles foram negativos quando testados não-diluídos nas reações de micro e macroimunodifusão.

A comparação entre os títulos em ambas as reações de imunodifusão foi realizada em 40 dos 103 soros de pacientes portadores de paracoccidiodomicose. Os resultados foram semelhantes, porém com tendência a títulos mais elevados (1:4, 1:8) na microimunodifusão. Na maioria dos soros, os títulos de cada soro nas duas reações foram iguais (n = 25) ou variaram apenas em uma diluição (n = 15). Dois soros (5%) apresentaram títulos maiores de duas diluições na reação de microimunodifusão.

TABELA I

Distribuição de 40 soros de pacientes portadores de paracoccidiodomicose segundo os títulos nas reações de micro e macroimunodifusão.

REAÇÃO	TÍTULOS						Total
	Não Diluído	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Micro-Teste	4	8	10	9	2	7	40
Macro-Teste	7	11	6	5	2	9	40

## DISCUSSÃO

A reação de microimunodifusão como aqui utilizada permite o teste simultâneo de 102 soros por placa, com pequeno gasto de material e de tempo. O método apresentou 100% de sensibilidade e de especificidade, quando testado contra painel de soros de pacientes com paracoccidiodomicose e com várias doenças não-micóticas, respectivamente. O teste revelou maior sensibilidade do que o macrométodo (100% vs

87%), além de ter fornecido títulos mais elevados e maior número de bandas. Além disto, as bandas no micrométodo foram mais nítidas e fáceis de serem visualizadas. Este achado é explicado pelo fato da precipitação antígeno-anticorpo ocorrer apenas na delgada camada de ágar localizada entre a matriz com orifícios e a camada inferior de ágar<sup>3,7</sup>.

Anteriormente, KAUFMAN<sup>3</sup> testou alguns soros de paracoccidiodomicose nesta reação, tendo observado grande sensibilidade e especificidade. Mais tarde, YARZABAL et al.<sup>8</sup> utilizaram uma variante do método, realizada em lâminas microscópicas, com orifícios cortados através de toda a espessura do agar e capacidade de se testar apenas 12 soros simultaneamente; a sensibilidade reportada foi igual à do macrométodo.

Como a microimunodifusão é método econômico em termos do material utilizado, bem como do tempo para sua realização, acreditamos frente a estes resultados preliminares que ela poderá substituir o macrométodo, especialmente em laboratórios com grande rotina sorodiológica ou experimental.

## SUMMARY

### Microimmunodiffusion test for the serodiagnosis of paracoccidiodomycosis

We used the micro- and macroimmunodiffusion test for the qualitative and quantitative measurement of anti — *P. brasiliensis* antibodies in serum of patients with paracoccidiodomycosis. All 103 paracoccidiodomycosis sera (100%) were positive in the microtest versus 87% positivity index in the macrotest. All 83 control sera from patients with other diseases were negative in both tests. Titers of the positive sera tended to be higher in the microtest, which revealed sharper and easier to read precipitating bands. Microimmunodiffusion is simple to be performed, requires a minimum amount of reagents and allows the simultaneous testing of 102 sera. It may replace the macrotest specially in laboratories dealing with great serologic routine.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio técnico de Marino Alves da Cunha e Claudinei Jurandir Figueira, e ao Dr. Paul Standard, do CDC, Atlanta, pela doação das matrizes para os testes. Trabalho parcialmente financiado por bolsa FINEP Nº 42.87.0395.00.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUSEY, J. F. & HINTON, P. F. — Precipitins in histoplasmosis. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 92: 637-639, 1965.
2. HUPPERT, M. — Macroprueba de inmunodifusion en gel de agar. In: **Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnóstico de las micosis sistemicas**. Parte I. Pruebas de inmunodifusion en agar. Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, 1972. p. 3-9.
3. KAUFMAN, L. — Micropruebas de inmunodifusion en gel de agar. In: **Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnostico de las micosis sistemicas**. Parte I. Pruebas de inmunodifusion en agar. Washington, Organizacion Panamerican de la Salud, 1972. p. 10-16.
4. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
5. MISTRETA, T.; SOUZA, M. S.; CHAMMA, L. G.; PINHO, S. Z. & FRANCO, M. — Serology of paracoccidiodomycosis. I. Evaluation of the indirect immunofluorescent test. *Mycopathologia (Den Haag)*, 89: 13-17, 1985.
6. PERAÇOLI, M. T. S.; MOTA, N. G. S. & MONTENEGRO, M. R. — Experimental paracoccidiodomycosis in the Syrian hamster. Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. *Mycopathologia (Den Haag)*, 79: 7-17, 1982.
7. STANDARD, P. G.; KAUFMAN, L. & WHALEY, S. D. — **Exoantigen test**. Rapid identification of pathogenic mould isolates by immunodiffusion. Procedure guide. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985. p. 29-39. (Immunology Series, no. 11).
8. YARZABAL, L. A.; ALBORNOZ, M. B.; CABRAL, N. A. & SANTIAGO, A. R. — Specific double diffusion micro-technique for the diagnosis of aspergillosis and paracoccidiodomycosis using monospecific antisera. *Sabouraudia*, 16: 55-62, 1978.

Recebido para publicação em 6/6/1988.