

## NATUREZA DE ANTICORPOS PRECIPITANTES ESPECÍFICOS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE (BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA), REVELADOS POR CONTRA-IMUNOELETROFORESE

Adhemar Mário FIORILLO (1) e Roberto MARTINEZ (2)

### RESUMO

Os Autores estudaram soros de 20 pacientes, portadores de paracoccidiodomicose (blastomicose Sul-Americana), utilizando coluna de Sephadex G-200 para a separação das imunoglobulinas e o método de contra-imunoelectroforese em agarose para a verificação de anticorpos específicos aos fungos. Como antígeno usaram culturas de *Paracoccidiodoides* em fase de levedura, tratadas por ultra-som. Os soros dos pacientes que apresentaram 1, 2, 3 ou 4 linhas de precipitação foram separados em coluna e as frações obtidas foram concentradas e examinadas em contra-imunoelectroforese, com o antígeno citado. Verificaram, assim, que apenas as frações com teor conveniente de imunoglobulinas IgG reproduziram os achados obtidos com os soros totais correspondentes; as frações com teor normal de IgA e IgM e com quantidade pequena ou nula de IgG não produziram linha de precipitação. Concluem que os anticorpos precipitantes em gel específicos do *Paracoccidiodoides* são do tipo IgG.

### INTRODUÇÃO

A contra-imunoelectroforese (imunoelectroosmoforese) tem sido utilizada no diagnóstico sorológico da paracoccidiodomicose, com resultados promissores. Seu emprego é relativamente recente, tendo desenvolvimento maior nestes últimos cinco anos (CONTI-DIAZ & col.<sup>2</sup>, BARBOSA & col.<sup>1</sup> e MARTINEZ & col.<sup>7</sup>). As linhas de precipitação obtidas nesse processo variam, em número, de 1 a 4 ou mais. Por outro lado, é conceito antigo de que a presença de precipitinas, em tubo, no soro de pacientes com paracoccidiodomicose indica fase aguda da doença (FAVA NETTO & col.<sup>4</sup>). MOTA & col.<sup>8</sup> não encontraram correlação entre os teores desse tipo de precipitinas com os das imunoglobulinas IgM, que refletiriam a fase aguda da doença. Procuramos verificar, por

isso, de que tipo são as precipitinas reveladas através da contra-imunoelectroforese.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados soros de 20 pacientes com paracoccidiodomicose, na maioria com formas clínicas de certa gravidade, do Hospital das Clínicas da F.M.R.P. — USP, Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias. O diagnóstico foi sempre confirmado através do achado do *Paracoccidiodoides*, em tecidos ou secreções.

**Antígeno** — o antígeno utilizado foi obtido de leveduras de *P. brasiliensis*, em suspensão a 20% em PBS, pH = 7,2; as leveduras foram lisadas com ultra-som, 100W\*, por 20 minutos. Após a centrifugação a 3000 r.p.m., durante 20

(1) Professor Titular e Chefe da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Clínica Médica da F.M.R.P.-USP

(2) Professor Assistente-Doutor da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Clínica Médica da F.M.R.P.-USP

minutos, separou-se o sobrenadante, que foi usado como antígeno. As cepas de **Paracoccidioides** foram obtidas de cultura de material retirado das lesões dos doentes citados.

**Contra-imunoeletroforese** — foi executada em agarose, pelo método de GREENWOOD & col.<sup>6</sup>.

**Separação das imunoglobulinas dos soros** — As imunoglobulinas foram separadas em coluna de Sephadex, G-200\*\*, pelo método de FAHEY & TERRY<sup>3</sup>. A coluna tinha as dimensões de 2,5 x 80,0 cm; a eluição foi executada com NaCl, 0,3M. As frações, em volume de 5,0 ml cada, foram recolhidas em coletor de amostras automático e a curva de separação foi determinada com o auxílio de espectrofotômetro\*\*\*, em comprimento de onda de 280 nm. Foram feitos pools, correspondentes às frações indicadas nas Figs. 1, 2, 3 e 4. As imunoglobulinas contidas nas frações indicadas nessas figuras foram identificadas através de imunoeletroforese em ágar, pelo método de SCHEIDEGER<sup>9</sup>, após concentração por ultra-filtração\*\*\*\* e per-vaporação no vácuo, em tubo de diálise\*\*\*\*\*. Usou-se, para isso, soros específicos, anti IgG, IgA e IgM\*\*\*\*\*.

## RESULTADOS

A análise dos soros dos pacientes com paracoccidioidomicose, pela contra-imunoeletroforese, revelou de uma a quatro linhas de precipitação. Os soros totais, separados em coluna de Sephadex G 200, analisados em suas diferentes frações, no que diz respeito à sua composição em imunoglobulinas e a presença ou não de anticorpos precipitantes em contra-imunoeletroforese, apresentaram os resultados que são condensados nos 4 exemplos seguintes:

**I — Soro 12, do paciente JBM** — O soro total, em contra-imunoeletroforese, mostrou 2 li-

\* Homogeneizador B Braun

\*\* Sephadex G 200, Pharmacia — Upsala (40-120 $\mu$ )

\*\*\* Espectrofotômetro Gilford-Instrument — 240

\*\*\*\* Câmara de ultra-filtração Amincon Corp. Lexington Mass — USA

\*\*\*\*\* Tubo de diálise 1/4 in., Arthur Thomas Co., Cat. n.º 3787 D12

\*\*\*\*\* Goat anti-human IgG, IgA e IgM — Tago, Incorp.

nhas de precipitação; das frações separadas em Sephadex (Fig. 1), de número 1, 2 e 3, apenas a fração 3 revelou 2 linhas de precipitação, idênticas às obtidas com o soro total. A imunoeletroforese mostrou teor quase normal de IgM e valores desprezíveis de IgA e IgG na fração 1; quantidade quase normal de IgA, teor desprezível de IgG e nulo de IgM na fração 2; valores normais de IgG e IgA e nulo de IgM na fração 3 (Fig. 2).

**II — Soro 13, do paciente MACR** — O soro total, em contra-imunoeletroforese, mostrou 2 linhas de precipitação; das frações separadas em Sephadex (Fig. 3), de número 1, 3 e 4, apenas a fração 4 revelou 2 linhas de precipitação, idênticas às obtidas com o soro total. A imunoeletroforese mostrou quantidade razoável de IgM, pequena quantidade de IgA e nula de IgG na fração 1; quantidades quase normais de IgG e IgA e nula de IgM na fração 3; teores normais de IgG e IgA e nulo de IgM na fração 4 (Fig. 4).

**III — Soro 18, do paciente JRO** — O soro total revelou, em contra imunoeletroforese, 3 linhas de precipitação; das frações separadas em

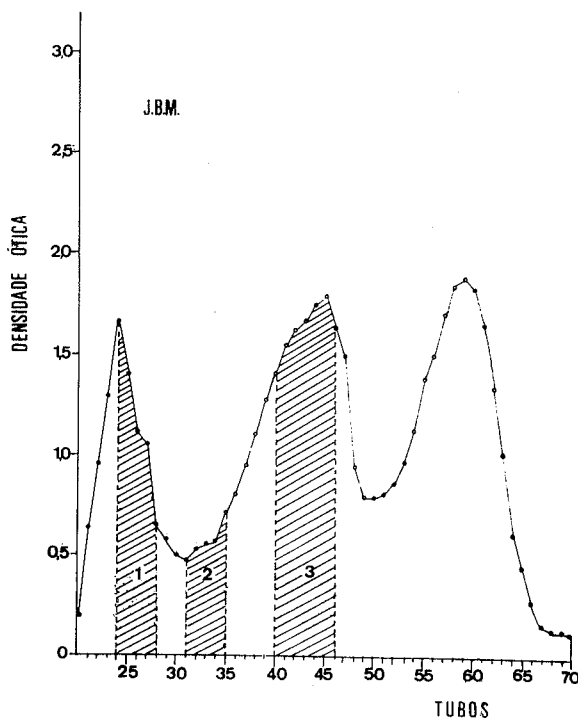


Fig. 1 — Separação do soro 12, do paciente JBM, em Sephadex G 200.

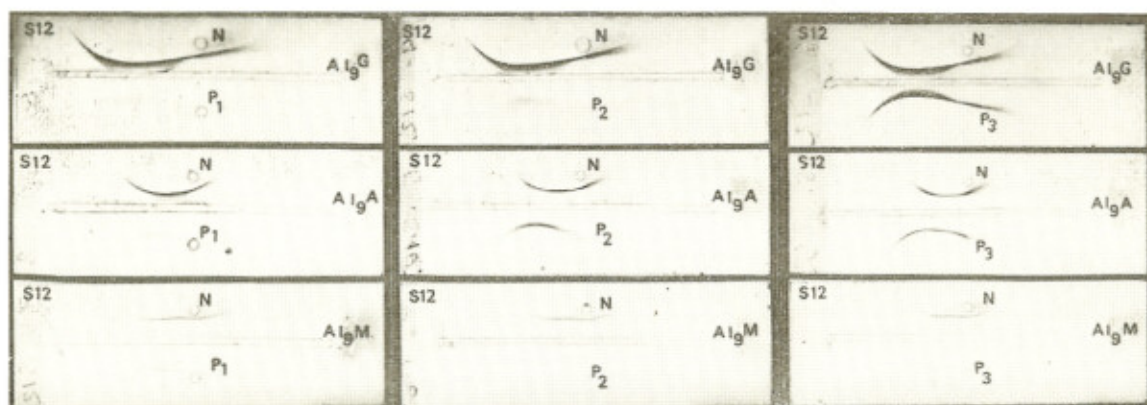


Fig. 2 — Soros 12: Imunoelektroforese das frações (pools) registradas na Fig. 1. N — soro normal; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub> — frações 1, 2 e 3 correspondentes à Fig. 1.

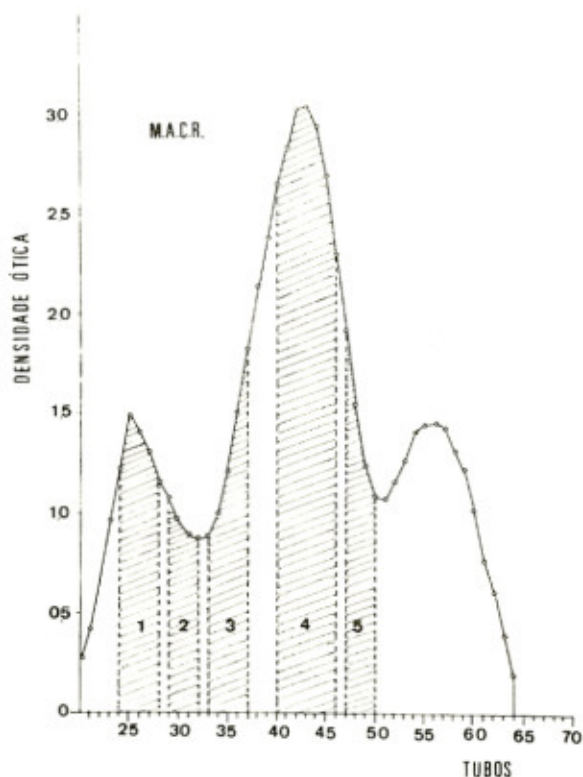


Fig. 3 — Separação do soro 13, do paciente MACR, em Sephadex G 200.

Sephadex (Fig. 5), revelaram uma linha de precipitação as frações 3 e 4; duas linhas a fração 5 e três linhas a fração 6; as da fração 6 foram idênticas às obtidas com o soro total. A imunoelektroforese mostrou teor normal de IgA, pequena quantidade de IgG e nula de IgM na fração 4; teor quase normal de IgG, razoável de IgM e nula de IgA na fração 5; quantidade

normal de IgG, pequena quantidade de IgA e quantidade nula de IgM na fração 6 (Fig. 6).

IV — Soro 1, do paciente MV — O soro total mostrou 4 linhas de precipitação em contra-immunoelektroforese; das frações separadas em Sephadex (Fig. 7), a fração 3 apresentou as 4 linhas obtidas com o soro total. A imunoele-

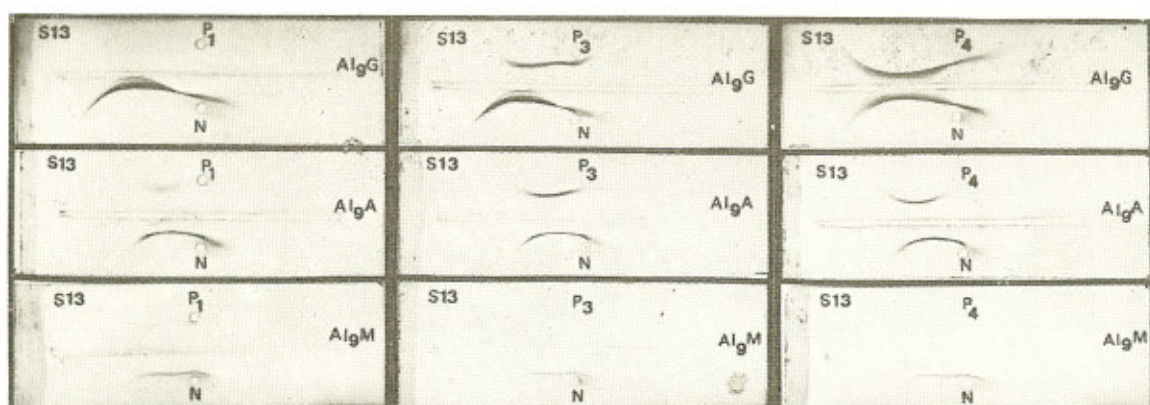


Fig. 4 — Soro 13: Imunoelektroforese das frações (pools) registradas na Fig. 3.  
N — soro normal; P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>4</sub> — frações 1, 3 e 4 correspondentes à Fig. 3.

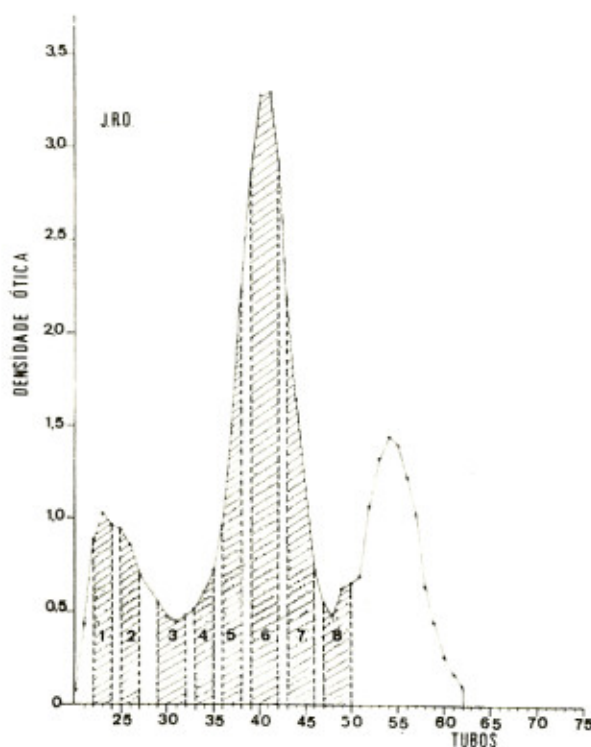


Fig. 5 — Separação do soro 18, do paciente JRO, em Sephadex G 200.

troforese revelou teor quase normal de IgG, pequena quantidade de IgA e razoável de IgM na fração 1; teor desprezível de IgG, pequena quantidade de IgA e nula de IgM na fração 2; teor normal de IgG, pequena quantidade de IgA e nula de IgM na fração 3 (Fig. 8).

#### COMENTARIOS

Analisando nossos resultados, podemos concluir que pequena quantidade de IgG de soro

de doente de paracoccidioidomicose, separada em coluna e Sephadex, tem condições de determinar o aparecimento de uma linha de precipitação, em contra-immunoelektroforese, utilizando-se como antígeno um lisado do **Paracoccidioides**; que quantidades normais de IgG, obtidas da mesma maneira, podem reproduzir todas as linhas de precipitação reveladas pelo soro total correspondente. Por outro lado, teores de IgA não têm relação com os resultados ob-

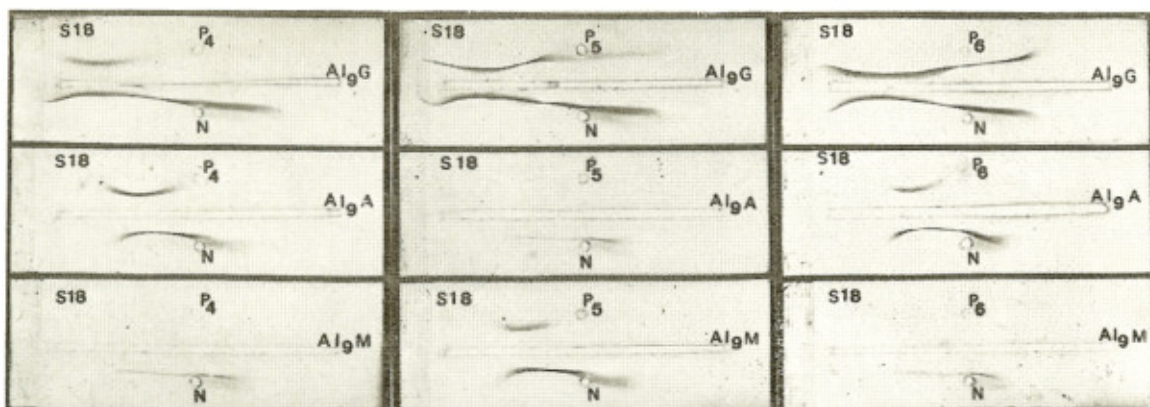


Fig. 6 — Soro 18: Imunoelektroforese das frações (pools) registradas na Fig. 5. N — soro normal; P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub> e P<sub>6</sub> — frações 4, 5 e 6 correspondentes à Fig. 5.

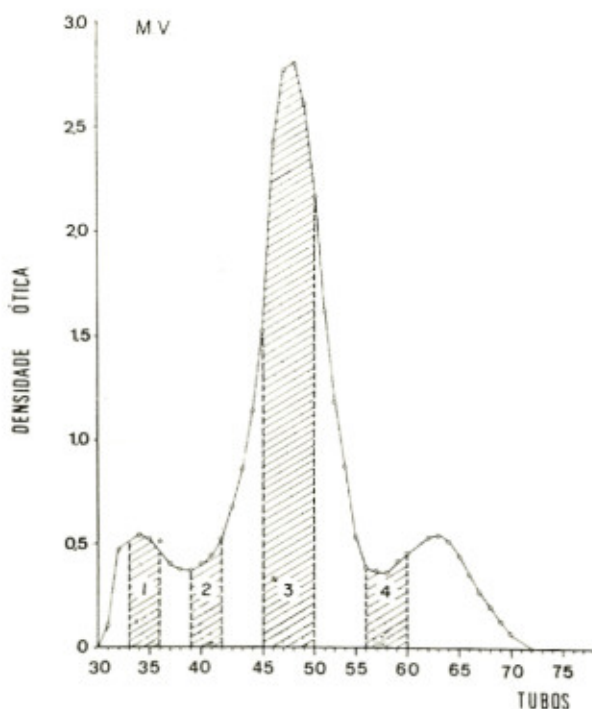


Fig. 7 — Separação do soro 1, do paciente MV, em Sephadex G 200.

tidos pela contra-immunoelektroforese do soro total correspondente; a imunoglobulina IgM, separada em grau elevado de pureza, e em quantidade que se avizinha da de um soro normal, não produz linha de precipitação no processo de contra-immunoelektroforese. O surgimento de 1, 2, 3 ou 4 linhas de precipitação, nesse processo de exame de soros de doentes com paracoccidioidomicose, depende exclusivamente de imunoglobulinas de tipo IgG.

MOTA & FRANCO<sup>8</sup>, trabalhando com imunofluorescência indireta, prova de precipitação em tubo e dosagem das imunoglobulinas IgM por difusão radial, concluíram que os teores dessa fração não se correlacionam com os das precipitinas. Esses achados vêm em apoio à nossa conclusão, de que os anticorpos precipitantes específicos dos soros dos doentes com paracoccidioidomicose são do tipo IgG.

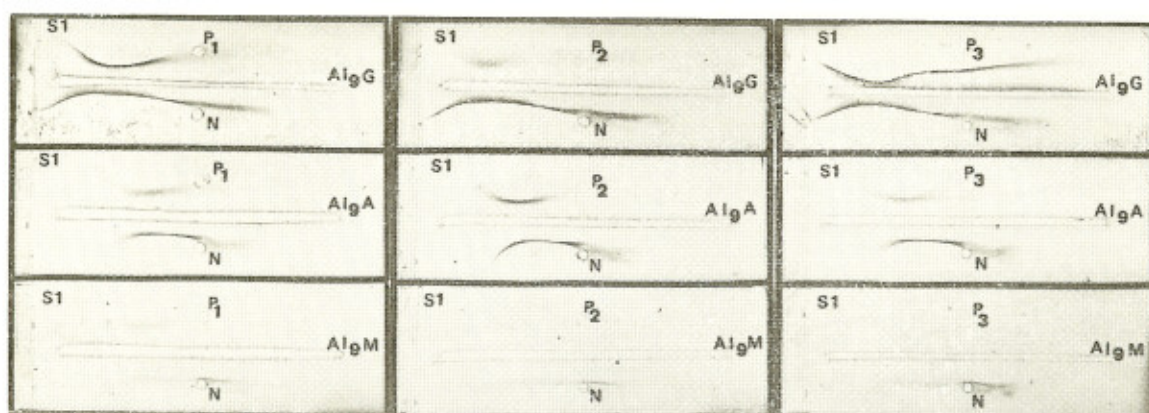


Fig. 8 — Soro 1: Imunoelektroforese das frações (pools) registradas na Fig. 7. N — soro normal; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub> — frações 1, 2 e 3 correspondentes à Fig. 7.

### SUMMARY

#### The nature of the precipitating specific antibodies of the paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) revealed by counterimmunoelectrophoresis.

The sera of 20 patients with paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) were studied using a column of Sephadex G-200 for immunoglobulin separation and agarose gel counterimmunoelectrophoresis for the determination of specific anti-fungus antibodies. Sonicated yeast phase *Paracoccidioides* cultures were used as antigen. The sera that showed 1, 2, 3 or 4 precipitation bands were separated by column chromatography and the fractions obtained were concentrated and examined by counterimmunoelectrophoresis with the same antigen. Only the fractions with appropriate levels of IgG immunoglobulins reproduced the results obtained with the corresponding whole sera, whereas fractions with normal IgA and IgM levels and with little or no IgG produced no precipitation bands. It is concluded that the precipitating antibodies with specificity for the *Paracoccidioides* are of the IgG type.

### AGRADECIMENTO

Agradecemos à Preparadora Luzia de Oliveira pela sua colaboração técnica.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BARBOSA, W.; BLAU, E.; MENDONÇA, J. R. & OLIVEIRA, R. L. de — Crossing-over immunoelectrophoresis applied to the study of immunology of South Ame-

rican blastomycosis. Previous note. *Rev. Pat. trop.* 2: 73-76, 1973.

- CONTI-DIAZ, I. A.; SOMMA-MOREIRA, R. E.; GEZUELE, E.; GIMÉNEZ, A. C. de; PENA, M. I. & MACKINNON, J. E. — Immunoelectroosmophoresis — immunodiffusion in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 11: 39-41, 1973.
- FAHEY, J. L. & TERRY, E. W. — Ion exchange chromatography and gel filtration. In WEIR, D. M. — *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford, Blackwell, 1967.
- 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 de complemento e de precipitação. *Med. Cirurg. Farm.* 277: 157-163, 1959.
- FRANCO, M. F.; FAVA NETTO, C. & CHAMMA, L. G. — Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação do complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15: 393-398, 1973.
- GREENWOOD, B. M.; WITTLE, H. C. & DOMINIC RAJKOVIC, O. — Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet* 2: 519-521, 1971.
- MARTINEZ, R.; FIORILLO, A. M. & COSTA, J. C. — A contra-immunoelektroforese no diagnóstico da paracoccidioidomicose. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, XV, Campinas, SP, 1979.
- MOTA, F. T. & FRANCO, M. F. de — Observações sobre a pesquisa de anticorpos IgM anti-*Paracoccidioides brasiliensis*, por imunofluorescência no soro de pacientes com paracoccidioidomicose. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 21: 82-89, 1979.
- SCHEIDEGER, J. J. — Une microméthode de l'immuno-électrophorèse. *Internat. Arch. Allergy & Appl. Immunology* 7: 103-110, 1955.

Recebido para publicação em 9/3/1983.