

ANTICORPOS ESPECIFICOS DAS CLASSES IgG, IgM E IgA PARA PARACOCCIDIOIDE BRASILIENSIS DOSADOS ATRAVÉS DA REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA NO SORO DE PACIENTES E SUA CORRELAÇÃO COM O TEMPO DE EVOLUÇÃO E FORMA CLÍNICA DA DOENÇA *

Sônia França Correia BARBOSA **
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Jorge CHACHA ***
Luiz Carlos CUCE ***
Celeste FAVA NETTO ****

RIALA6/535

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C.
— Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

RESUMO: Foram estudados 18 pacientes com paracoccidiodomicose com a finalidade de comparar a reação de imunofluorescência indireta com as reações de fixação de complemento e precipitação feita em tubos. Foi constatada correlação da reação de imunofluorescência indireta e da reação de fixação de complemento, tendo sido sugerido o seu emprego no diagnóstico da doença. Não foi possível correlacionar a presença de IgG, IgM e IgA específicas para *Paracoccidioide brasiliensis* com as formas clínicas da doença; no entanto, notou-se que imunoglobulinas do tipo IgM estavam presentes em doentes com comprometimento ganglionar. Quanto ao tempo da doença verificou-se que o IgA específico para *P. brasiliensis* apresentava-se sempre positivo em maior porcentagem nos casos de tempo de evolução inferior a um ano.

DESCRIPTORIOS: paracoccidiodomicose, técnicas de diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Atualmente o diagnóstico laboratorial da paracoccidiodomicose é feito em nosso meio através das seguintes provas: pesquisa direta do parasita nas lesões, intradermo-reação (IDR) e reações sorológicas; entre estas, as mais utilizadas são a de fixação de complemento (FC)² e a de precipitação em tubos (PP)¹.

Os títulos de anticorpos, medidos através da reação de fixação de complemento, dão

uma boa avaliação prognóstica da moléstia. A reação de precipitação em tubos detecta anticorpos mais precocemente do que a reação de fixação de complemento. Todavia, existe um bom número de casos em que não se demonstram anticorpos precipitantes, mesmo quando a moléstia se encontra em atividade¹. Quanto à IDR, verificou-se que a positividade não ultrapassava 90% com qualquer dos tipos de antígenos empregados nesta reação. Destaca-se, ainda, que os pacientes gravemente enfermos reagem negativamente ao teste intradérmico.

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP.

**** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

Trabalhos de RESTREPO & MONCADA⁶, e de FRANCO *et alii*⁷ sugerem o uso da reação de imunofluorescência indireta (IFI) no diagnóstico da paracoccidiodomicose.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o emprego da reação IFI para o diagnóstico da moléstia e, neste sentido, propomos-nos a: a) comparar a reação de IFI com as reações de FC e PP no soro de pacientes portadores da moléstia; b) quantificar nestes soros, através da reação IFI, com emprego de conjugados monoespecíficos, as diferentes classes de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e tentar relacioná-los com alguns parâmetros clínicos, como a forma da doença e o tempo de evolução da mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros

Foram examinados 18 soros de pacientes de paracoccidiodomicose, provenientes da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Todos os casos foram confirmados por exame histopatológico ou biópsia. Realizaram-se levantamento e estudo dos prontuários dos respectivos pacientes, para a obtenção dos seguintes dados: procedência, idade, cor, tempo de evolução da doença e tipo de lesões apresentadas pelos portadores da moléstia. Foram estudados também 30 soros de portadores de outras micoses, com FC negativa (19 com candidíase, 9 com histoplasmose e 2 com a doença de Jorge Lobo).

Como controles normais foram coletados 23 soros de doadores de sangue, supostamente saudáveis. Todos os soros foram inativados a 56°C, durante 30 minutos, e conservados a -20°C, sem a adição de preservativos.

Antígeno para reação de imunofluorescência indireta

A cepa *P. brasiliensis* utilizada para a extração do antígeno foi isolada de doente clinicamente diagnosticado, tendo sido mantida por subcultivo em garrafa de Roux com 150 ml de ágar Sabouraud, por uma semana, a 37°C.

As culturas, após este período de tempo, foram suspensas em solução salina, contendo 0,1% de formaldeído*, e submetidas a agitação constante por 18 horas, a 4°C.

O *P. brasiliensis* foi separado por centrifugação, a 1 400 g, sob a temperatura de -4°C, durante 10 minutos, sendo em seguida lavado 3 vezes em solução salina tamponada (pH 7,2) e acertada a concentração final por leitura em espectrofotômetro** (650 nm para D.O. ± 0,523). O antígeno foi depositado em lâminas de imunofluorescência, que foram

secadas ao ar e/ou em estufa a 37°C, e finalmente fixado em chama, sendo em seguida as lâminas embrulhadas em papel alumínio e mantidas a -20°C.

Conjugado

Foram empregados os conjugados anti-Ig total, anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA humanas, obtidos de coelhos (do Instituto Adolfo Lutz), marcados com isotiocianato de fluoresceína, sendo a especificidade dos conjugados comprovada por imunoelectroforese.

Reação de imunofluorescência indireta

Foi realizada segundo a técnica de RESTREPO & MONCADA⁶, tendo sido feitas diluições sucessivas em todos os soros acima, de razão 2 até 1:1024 (com o uso dos conjugados específicos, foram tituladas as imunoglobulinas totais e as frações IgG, IgM e IgA, específicas para *P. brasiliensis*. Soros com título de anticorpo Ig total igual ou maior de 1:16 foram considerados como positivos.

Reação de fixação de complemento

Foi realizada, segundo a técnica descrita por FAVA NETTO⁸, usando-se os soros acima referidos.

Reação de precipitação em tubos

Foi realizada segundo a técnica descrita por FAVA NETTO⁸, usando-se os soros acima referidos.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados obtidos com os 18 soros de pacientes portadores da moléstia, submetidos às reações de IFI, FC e PP, com antígeno polissacarídico. Nos 18 casos com lesões em atividade, 100% foram positivos nas reações de IFI e FC, enquanto apenas 16,6% foram positivos no teste PP.

A tabela 2 relaciona a forma clínica da doença apresentada nos pacientes com paracoccidiodomicose e a positividade dos anticorpos IgG, IgM e IgA, específicos para *P. brasiliensis*, titulados por IFI. Verifica-se que o IgG apresenta positividade em todas as formas clínicas, enquanto o mesmo não ocorre com o IgM, que se tornou positivo nos casos em que existia lesão ganglionar (2 doentes na forma linfática e 3 doentes na forma mista) e em um caso na forma mista com lesões cutâneas viscerais que acarretaram várias internações. Quanto ao IgA, a positividade encontrada foi de 4 casos de forma tegumentar, 2 de forma linfática e 5 de forma mista.

* E. Merck, solução a 35%.

** Bauch & Lomb, spectronic 88.

TABELA 1

Resultados das reações de imunofluorescência indireta, fixação de complemento e precipitação em tubos em 18 soros de pacientes portadores de paracoccidiodomicose, frente ao tempo de evolução da doença e tipo de lesão apresentada

Paciente	Tempo de evolução	Tipo de lesão	Classificação da lesão	Imunofluorescência indireta (título)				Fixação de complemento	Precipitação em tubos
				Y	IgG	IgM	IgA		
M. T. A.	8 a	cutânea-mucosa-pulmonar	mista	1:256	1:256	neg.	neg.	124,0	neg.
B. A. S.	1 a	cutânea-pulmonar	mista	1:128	1:128	neg.	1:4	23,0	neg.
D. M. P.	3 a	mucosa (lábio)-pulmonar	mista	1:128	1:128	neg.	1:16	12,0	neg.
R. R.	35 d	mucosa-pulmonar	mista	1:256	1:256	neg.	neg.	17,0	neg.
C. A. O.	12 a	cutânea-visceral	mista	1:128	1:128	1:16	1:32	34,0	neg.
L. M. A.	3 a	cutânea-mucosa-ganglionar	mista	1:256	1:32	1:32	neg.	177,0	pos. (++++)
H. H.	1 a	cutânea-pulmonar-ganglionar	mista	1:256	1:256	1:32	1:16	135,0	pos. (++)
R. F. O.	1 a	mucosa-ganglionar	mista	1:64	1:64	1:16	1:4	3,5	neg.
D. S.	1 a	ganglionar	ganglionar	1:128	1:128	1:64	1:16	144,0	pos. (++++)
L. P. F.	5 a	ganglionar	ganglionar	1:256	1:64	1:16	1:32	54,0	neg.
E. R.	6 a	cutânea	tegumentar	1:256	1:256	neg.	neg.	11,0	neg.
H. S.	2 a	cutânea-mucosa	tegumentar	1:256	1:128	neg.	neg.	20,0	neg.
J. R. L.	2 a	cutânea-mucosa	tegumentar	1:512	1:256	neg.	1:16	69,0	neg.
P. P.	4 m	mucosa (lábio)	tegumentar	1:256	1:256	neg.	1:16	26,0	neg.
P. C.	7 a	cutânea-mucosa	tegumentar	1:64	1:64	neg.	neg.	165,0	neg.
L. F. R.	3 m	mucosa (lábio)	tegumentar	1:32	1:32	neg.	1:16	19,7	neg.
J. A. C.	7 a	mucosa (lábio)	tegumentar	1:64	1:64	neg.	neg.	55,0	neg.
P. P.	4 m	mucosa	tegumentar	1:64	1:32	neg.	1:32	2,7	neg.

d = dias
m = meses
a = anos

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCHE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidiodiopsis brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioides brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

TABELA 2

Relação entre a forma clínica apresentada pelos pacientes de paracoccidioidomicose e a positividade dos anticorpos IgG, IgM e IgA demonstrada por imunofluorescência indireta

Forma clínica	N.º de casos	N.º de casos positivos		
		Anticorpos		
		IgG	IgM	IgA
Tegumentar	8	8	0	4
Linfática	2	2	2	2
Mista	8	8	4	5
Total de casos	18			

Relacionando-se o tempo de evolução da doença e a presença de imunoglobulinas G, M e A de anti-*P. brasiliensis* (tabela 3), nota-se que o IgG não apresentou variações, sendo positivo em todos os casos, enquanto que o IgM apresentou maior número de casos, 37,5%, no intervalo compreendido de 1 a 12 meses, e 20%, de 13 meses a doze anos. Estas diferenças não foram significativas porque, como foi demonstrado pelos resultados da tabela 2, a presença de IgM está mais ligada à forma clínica de que ao tempo de evolução da doença.

Quanto à presença de IgA, verifica-se que maior porcentagem, 87,5%, situa-se na faixa de 1 a 12 meses de idade, baixando para 40%, na faixa de 13 meses a 12 anos. Os 8 casos compreendidos num intervalo de 1 a 12 meses apresentaram-se positivos, com exceção de um caso de 35 dias.

Foi verificada a presença de reações cruzadas frente ao antígeno utilizado na IFI (tabela 4). Cinquenta e três soros controle (19 de candidíase, 9 de histoplasmose, 2 de doença de Jorge Lobo e 23 de doadores de sangue, supostamente sadios), negativos na reação de FC, foram testados frente a células de *P. brasiliensis* e os títulos de anticorpos totais foram comparados com os dos pacientes de paracoccidioidomicose.

Observou-se a presença de reação cruzada com os 2 soros provenientes de portadores da doença de Jorge Lobo.

Quanto aos restantes soros do grupo-controle, observamos que 43 soros não foram reativos e 8 não tiveram títulos de anticorpos superiores a 1:8 na IFI para *P. brasiliensis*.

Todos os 18 soros de doentes de paracoccidioidomicose tiveram título de anticorpos igual ou superior a 1:32 na IFI.

TABELA 3

Positividade da imunofluorescência indireta para IgG, IgM e IgA, e tempo de evolução da moléstia

Anticorpos	Tempo de evolução da moléstia			
	1 mês — 12 meses		13 meses — 12 anos	
	Casos		Casos	
	n.º	%	n.º	%
IgG	8	100	10	100
IgM	3	37,5	2	20
IgA	7	87,5	4	40

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

TABELA 4

Títulos de anticorpos em 71 soros determinados por imunofluorescência indireta, em presença de células de Paracoccidioide brasiliensis

Grupos	N.º de soros									Total de casos
	Título de anticorpos									
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	Neg.	
Candidíase	2	5	—	—	—	—	—	—	12	19
Histoplasmose	1	—	—	—	—	—	—	—	8	9
Doença de Jorge Lobo	—	—	—	1	1	—	—	—	—	2
Doadores de sangue	—	—	—	—	—	—	—	—	23	23
Paracoccidioideomicose	—	—	—	1	4	4	8	1	—	18

Observação: nota-se presença de reação cruzada somente na doença de Jorge Lobo.

CONCLUSÕES

Das três reações analisadas, a reação de precipitação em tubos mostrou ser a menos sensível, enquanto que houve correlação entre as reações de imunofluorescência indireta e fixação de complemento.

A reação IFI poderá ser utilizada como uma das técnicas com finalidade diagnóstica, apresentando a vantagem de poder ser aplicada em soros anticomplementares.

Embora não se tenha observado nenhuma correlação entre a presença de imunoglobulinas específicas do tipo IgG e IgA e as formas clínicas da doença, a presença de imunoglobulina específica do tipo IgM foi sempre demonstrada nos doentes com comprometimento ganglionar.

A presença de IgA foi verificada em maior porcentagem nos casos de tempo de evolução inferior a um ano.

A reação de IFI para paracoccidioideomicose é específica a partir da diluição de 1:16 do soro.

RIALA6/535

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Class IgG, IgM and IgA antibodies specific for *Paracoccidioidis brasiliensis* titrated through indirect immuno-fluorescence in the serum of 18 patients and their relationship to clinical form and duration of disease manifestations, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

ABSTRACT: A comparison of the indirect immuno-fluorescence test and the complement-fixation and test-tube precipitation tests was made in the sera of 18 patients with confirmed paracoccidioidomycosis. There was agreement between indirect immuno-fluorescence and complement fixation, a result which recommends the use of immuno-fluorescence for diagnosis. No correlation between clinical pictures and the presence of IgG, IgM and IgA specific for *P. brasiliensis* was noted. However, IgM was presented in lymph-node lesions. The specific IgA was found more frequently in patients with illness duration shorter than one year.

DESCRIPTORS: paracoccidioidomycosis, diagnose technics.

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAVA NETTO, C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 21:99-194, 1961.
2. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com o antígeno polissacarídico. *Arq. Cirurg. clín. exp.*, 18:197-254, 1955.
3. FAVA NETTO, C. — Imunologia da paracoccidiodomicose. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 18:42-53, 1976.
4. FAVA NETTO, C.; FERRI, R.G. & LACAZ, C.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. Cirurg. Farm.*, 277: 157-63, 1959.
5. 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 de complemento. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 15:393-8, 1973.
6. RESTREPO, M., A. & MONCADA F., L.H. — Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidiodomycosis. *Appl. Microbiol.*, 24:132-7, 1972.

Recebido para publicação em 20 de julho de 1981.