

## CONTRIBUIÇÃO À SOROLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE. COMPARAÇÃO ENTRE REAÇÕES DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO PELAS TÉCNICAS DE WADSWORTH, MALTANER & MALTANER E MICROMÉTODO E REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO E GEL DE ÁGAR

Celeste FAVA NETTO (1), Maria Auxiliadora Gurgel GUERRA (2), Elizabeth Oliveira da COSTA (3) e Paulo Hideki YASUDA (4)

### RESUMO

Foram selecionados 71 pacientes de paracoccidioidomicose com várias formas clínicas e em vários estágios evolutivos da moléstia, cujos soros foram submetidos a diferentes tipos de reações sorológicas. A reação de fixação do complemento revelou 100% de positividade pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e 97,2% pela do micrométodo. A reação de precipitação em meio líquido revelou 19,7% de positividade. Nestas três reações sorológicas foi utilizado o mesmo tipo de antígeno. A reação de precipitação em gel de ágar, na qual se empregou outro tipo de antígeno, revelou 40,8 e 50,7% de positividade para antígenos obtidos de duas amostras diferentes de *Paracoccidioides brasiliensis*.

### INTRODUÇÃO

Numerosas técnicas sorológicas vêm sendo empregadas na demonstração e titulação de anticorpos em pacientes de paracoccidioidomicose. Entre elas as de fixação do complemento e de precipitação em meio líquido e em gel de ágar tem merecido especial destaque (FAVA NETTO<sup>1, 2, 3</sup>; RESTREPO<sup>10, 11, 13</sup>; RESTREPO & MONCADA<sup>12</sup>; NEGRONI<sup>8</sup>; MAEKELT<sup>7</sup>).

Os antígenos utilizados pelos vários pesquisadores têm sido diferentes. Assim, FAVA NETTO<sup>1, 2, 3, 4</sup> utiliza fração polissacarídica obtida de várias amostras da fase leveduriforme do *P. brasiliensis*, sendo o antígeno obtido das próprias células leveduriformes por autoclavagem de suspensão de células em solução fisiológica tamponada com veronal. RESTREPO em seus trabalhos e naqueles em colaboração com outros pesquisadores, utili-

za antígeno representado pelos produtos metabólicos eliminados para o meio de cultura pelas fases leveduriforme e cotonosa de várias amostras de *P. brasiliensis*. NEGRONI<sup>8</sup> também se utiliza de produtos metabólicos, porém obtidos de modo diferente e em outro meio de cultura. MAEKELT<sup>7</sup> se utiliza de extratos.

As porcentagens de positividade encontradas por todos os investigadores citados, para a reação de fixação do complemento, têm sido altas, acima de 90% quando se pesquisa anticorpos no soro de pacientes de paracoccidioidomicose. A reação de fixação do complemento é portanto um ótimo método sorológico. O Subcomitê de Métodos Diagnósticos, do Comitê de Micologia da Organização Mundial de Saúde, tem, no entanto, o máximo interesse em padronizar os métodos so-

- (1) Professor Titular — Departamento de Microbiologia e Imunologia do I.C.B. da USP
- (2) Auxiliar de Ensino — Depto. de Microbiologia e Imunologia do I.C.B. da USP
- (3) Auxiliar de Ensino — Depto. Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP
- (4) Graduado em Farmácia e Bioquímica da USP

rológicos em todas as Américas e pretende introduzir o micrométodo de fixação do complemento, como padronizado no C.D.C. de Atlanta-Georgia, como método comum a todos os laboratórios envolvidos no programa. A presente pesquisa realizada com a finalidade de comparar o micrométodo com a técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner, que correntemente utilizamos em nosso laboratório, apresenta também os resultados obtidos nos mesmos soros, com reação de precipitação em meio líquido, realizada em tubos, com a utilização do mesmo antígeno. A reação de precipitação em gel de ágar, empregando antígenos metabólicos obtidos da fase cotonosa de duas amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, foi executada também nos mesmos soros, para comparação.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### Soros

Foi colhido sangue de 71 pacientes apresentando várias formas clínicas e diferentes fases evolutivas da moléstia, que estavam sob tratamento ou não, sendo que, alguns podiam ser considerados clinicamente curados. O sangue foi colhido com seringa e agulha bem secas e sob condições de esterilidade. O soro foi separado esterilmente e congelado a  $-25^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso quando era inativado a  $56^{\circ}$  durante meia hora.

##### Antígenos

Para a reação de fixação do complemento, tanto pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner como pelo micrométodo, foi utilizado o antígeno polissacárido descrito por FAVA NETTO & col.<sup>4</sup> O mesmo tipo de antígeno foi utilizado na reação de precipitação em meio líquido, realizada em tubos. Para a reação de precipitação em gel de ágar cada soro foi testado com dois antígenos metabólicos, obtidos pelo cultivo de duas amostras diferentes de *Paracoccidioides brasiliensis* em meio de SMITH<sup>15</sup> sob forma cotonosa, durante 4 meses. Os filtrados dessas culturas foram concentrados 10 vezes com auxílio de sacos de diálise por pervaporação em câmara fria, para serem empregados em reação de precipitação

em gel de ágar. A concentração proteica final era respectivamente de 11,0 mg/ml e 10,0 mg/ml para as amostras AS e 192 (Método de LOWRY & col.<sup>6</sup>).

*Reação de fixação do complemento pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner* — Realizada de acordo com a padronização feita por FAVA NETTO<sup>1</sup> para o sistema paracoccidiodomicose.

*Reação de fixação do complemento pelo micrométodo* — Realizada de acordo com as especificações do "Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test"<sup>16</sup>.

*Reação de precipitação em meio líquido* — Realizada de acordo com a técnica utilizada por FAVA NETTO<sup>2</sup>.

*Reação de precipitação em gel de ágar* — Realizada de acordo com as recomendações do "Manual of Standardized Serodiagnostic Procedures for Systemic Mycosis"<sup>9</sup>.

#### RESULTADOS

Os resultados obtidos pelas várias reações sorológicas se encontram no Quadro I.

Todos os pacientes são casos comprovados de paracoccidiodomicose e a positividade pela reação de fixação do complemento foi de 100% com a técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e de 97,2% com a técnica do micrométodo. Pela reação de precipitação em meio líquido a positividade foi de 19,7%. Pela reação de precipitação em gel de ágar a positividade foi de 40,8% com a amostra As e de 50,7% com a amostra 192 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Houve concordância de positividade com antígenos provenientes das duas amostras em 33,8% dos casos; positividade isolada para a amostra As em 7,0% e para a amostra 192 em 16,9% dos casos. A reação de precipitação em gel de ágar revelou na maioria das vezes somente uma faixa de precipitação. Raramente ocorreram duas faixas de precipitação.

#### DISCUSSÃO

A principal finalidade da pesquisa foi comparar as reações de fixação do complemento realizadas por duas técnicas diferen-

FAVA NETTO, C.; GUERRA, M.A.G.; COSTA, E.O. da & YASUDA, P.H. — Contribuição à sorologia da paracoccidiodomicose. Comparação entre reações de fixação do complemento pelas técnicas de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e micrométodo e reações de precipitação em meio líquido e gel de ágar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:81-86, 1976.

QUADRO I  
Resultados das reações sorológicas em pacientes de paracoccidiodomicose

Doentes de Blastomicose	W.M.M. (*)	MM (*)	Pp (*)	Gel-Pp (*)	
				AS	Amostras 192
AZ	4,0	1:32	—	+	—
AES	15,0	1:64	—	+	+
APP	24,0	1:32	—	—	—
AF	3,8	1:8	—	—	—
AN	2,5	1:32	++++	+	+
AL	14,0	1:32	—	+	+
AO	2,5	1:32	—	—	—
AMJ	42,0	1:32	—	+	—
AM	10,5	1:16	—	—	—
AP	28,0	1:32	—	+	+
AP	14,0	1:8	+++	—	—
AF	10,0	1:32	—	—	—
ARS	89,0	1:64	—	—	—
AS	30,0	1:32	—	+	+
ATG	2,0	1:8	—	+	+
BC	32,0	1:16	—	+	+
BRS	15,0	1:16	—	—	+
CAI	15,0	1:16	—	—	—
CAO	29,0	1:16	—	—	+
CF	29,0	1:32	—	—	+
DCS	2,2	1:8	—	+	+
DVS	11,0	1:32	—	—	+
DJD	37,0	1:32	—	—	+
ES	38,0	1:16	++++	—	+
ECC	16,0	1:16	—	—	+
ENS	30,0	1:16	—	+	+
G	15,0	1:32	—	+	+
GG	5,6	1:16	—	—	+
FBM	3,7	1:8	++++	+	—
HB	48,0	1:32	—	—	—
IR	3,2	1:32	++++	—	—
IPS	99,0	1:64	—	+	+
JBM	135,0	1:32	—	—	+
JB	5,0	1:16	—	+	+
JBM	11,0	1:8	+++	—	—
JCT	5,2	1:16	—	—	—
JDS	18,0	1:8	—	—	—
JGF	9,0	1:8	—	—	—
JJN	4,6	1:8	—	—	+
JLS	3,2	—	+++	—	—
JM	28,0	1:32	++	+	+
JOB	9,0	1:8	++++	—	+
JPS	4,0	—	—	—	—
LF	12,0	1:8	—	—	—
LB	97,0	1:32	—	+	+
LAC	2,5	1:16	—	—	—
LG	22,0	1:16	—	+	+
LPFF	31,0	1:32	—	—	—
LP	3,5	1:16	—	—	—
MAS	13,0	1:8	—	—	—
MFC	42,0	1:32	++++	+	+
MS	8,0	1:16	—	—	—
MB	7,5	1:8	—	—	+
MSC	10,0	1:16	—	+	+
MG	5,0	1:8	—	—	—

FAVA NETTO, C.; GUERRA, M.A.G.; COSTA, E.O. da & YASUDA, P.H. — Contribuição à sorologia da paracoccidiodomicose. Comparação entre reações de fixação do complemento pelas técnicas de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e micrométodo e reações de precipitação em meio líquido e gel de ágar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:81-86, 1976.

Doentes de Blastomicose	W.M.M. (*)	MM (*)	Pp (*)	Gel-PP (*)	
				AS	192
MHE	2,1	1:8	—	—	—
MP	4,8	1:8	—	—	—
NG	9,0	1:16	—	+	+
NRN	3,5	1:8	—	—	—
ORS	45,0	1:64	—	+	+
OM	28,0	1:16	+	+	+
PC	27,0	1:64	++++	—	—
PJC	33,0	1:16	—	—	—
PC	43,0	1:16	++++	+	+
RP	5,0	1:16	—	+	+
SAM	15,0	1:64	—	+	+
SMP	2,4	1:8	—	—	—
SB	12,0	1:16	++++	+	—
SM	15,0	1:16	—	—	—
SG	4,7	1:8	—	+	—
VV	12,5	1:16	—	+	+

- (\*) WMM — Reação de Fixação do Complemento pela Técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner  
 MM — Reação de fixação do Complemento pelo Micrométodo  
 Pp — Reação de Precipitação em meio líquido  
 Gel-Pp — Precipitação em ágar

tes: a de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e a do micrométodo do CDC. Pelos resultados do Quadro I verificamos que a RFC pela técnica de W.M.M. foi positiva em todos os soros e pela técnica do micrométodo foi negativa somente em 2 dos 71 soros. Houve concordância muito boa dos resultados obtidos pelas duas técnicas. Se considerarmos que o micrométodo utiliza soros diluídos inicialmente a 1:8 poderíamos considerar ser a concordância, entre as duas técnicas, absoluta, pois os 2 soros que revelaram resultados negativos pelo micrométodo eram de títulos baixos 3,2 e 4,0, respectivamente, pela técnica de W.M.M. Consideramos que tal concordância poderia ser esperada na experimentação levada a efeito. Isto porque as duas técnicas são muito bem padronizadas, ambas utilizando complemento titulado em unidades 50% de hemólise. Quando as técnicas são dignas de confiança e o antígeno empregado é o mesmo, é de se esperar a concordância nos resultados.

O mesmo não pode ser dito quanto à concordância dos títulos para os mesmos soros.

Há nítida discordância entre os títulos obtidos para um mesmo soro pelas duas técnicas em muitos dos 71 soros examinados. Nossa experiência com RFC pela técnica de W.M.M. nos demonstrou ser ela de ótima reprodutibilidade sendo seu erro intrínseco, no máximo, de 30% na reprodução do título de um soro, quando submetido a titulação por muitas vezes. Já o micrométodo, por utilizar diluições duplas do soro, tem como erro intrínseco do processo, 4 vezes o título determinado. Quando se pretende acompanhar a evolução de um paciente, sob tratamento ou não, construindo-se a curva sorológica através dos títulos de anticorpos fixadores do complemento obtidos em épocas sucessivas, preferimos a técnica mais rigorosa de titulação que é a de Wadsworth, Maltaner & Maltaner.

A reação de precipitação em meio líquido realizada em tubos de ensaio, utilizando-se o mesmo tipo de antígeno empregado na reação de fixação do complemento, revelou somente 19,7% de resultados positivos. Tal porcentagem não reproduz de modo algum nossa experiência anterior FAVA NETTO<sup>2,3</sup>.

Esta discordância nos permite algumas considerações sobre comparações de resultados de reações sorológicas, encontradas na literatura. Assim, muitas vezes, procura-se dar valor à maior positividade obtida em soros de grupo de pacientes portadores da moléstia por determinada técnica, comparando-se os resultados com aqueles obtidos por outros Autores, em grupos diferentes de pacientes. Ora, os resultados aqui obtidos, nos 71 pacientes examinados, pela reação de precipitação, realizada pela mesma técnica, no mesmo laboratório, empregando-se o mesmo antígeno, revelam positividade muito menor que nos grupos de pacientes anteriormente por nós examinados. Verificamos, por tais dados, que a comparação de técnicas de um mesmo método sorológico ou a comparação de antígenos com a mesma técnica, somente será válida quando executada com os mesmos soros.

O exame dos resultados da reação de precipitação em meio líquido comparativamente com aqueles obtidos pela reação de precipitação em gel de ágar, demonstram nitidamente que os antígenos responsáveis pela reação positiva em gel de ágar, não correspondem àquele que revela resultados positivos na reação realizada em meio líquido, fato que já havia sido demonstrado por LACAZ & col.<sup>5</sup>

A reação de precipitação em gel de ágar revelou resultados positivos em 40,8% dos casos com o antígeno metabólico da amostra AS e em 50,7% dos casos com aquele da amostra 192. Houve concordância de resultados em 33,8% dos casos nas reações obtidas com os antígenos das duas amostras. O antígeno da amostra AS revelou 7,0% de resultados positivos isoladamente e aquele da amostra 192, revelou 16,9% de resultados positivos isoladamente. A positividade obtida com a reação de precipitação em gel de ágar não se compara de modo algum com aquela obtida por outros pesquisadores RESTREPO<sup>10, 13</sup>, RESTREPO & MONCADA<sup>11, 12</sup>, RESTREPO & DROUHET<sup>14</sup>, NEGRONI<sup>8</sup>, YAZÁRBAL<sup>17</sup> e YAZÁRBAL & col.<sup>18</sup>

Nossos resultados são aqui mostrados para, mais uma vez, chamar a atenção para a heterogeneidade antigênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. As duas amostras aqui utilizadas não são homogêneas quanto à produção de

antígenos. Certamente ou apresentam componentes antigênicos diferentes ou liberam os componentes antigênicos em quantidades diferentes nos meios de cultura.

Quando se pretende realizar diagnóstico sorológico de paracoccidioidomicose, é de bom alvitre que o antígeno empregado seja obtido de várias amostras de *P. brasiliensis*. Em tais condições obter-se-á alta porcentagem de positividade com determinada reação sorológica.

#### SUMMARY

*Contribution to the paracoccidioidomycosis immunology. Comparison between the techniques of Wadsworth, Maltaner & Maltaner and micromethod for complement fixation and the precipitin reaction in liquid media and in agar gel.*

Sera from 71 selected paracoccidioidomycotic patients with different clinical forms and evolutive phases of the disease were submitted to different types of serological reactions. The complement fixation test gave 100% positivity by the Wadsworth, Maltaner & Maltaner technique and 97.2% positivity by micromethod. The precipitin reaction in tubes gave 19.7% positivity. In the precedent tests the same antigen was utilized. The agar gel precipitin reaction, for which another kind of antigen was employed, gave 40.8 and 50.7% positivity respectively for the antigens obtained from two different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*.

#### AGRADECIMENTO

Os Autores agradecem a cooperação prestada na execução da presente pesquisa pelos técnicos de laboratório Victor Salcedo Vega, Ida Mello Sciannaméa e Dante Brazil Guarnieri.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polisacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.* 18:197-254, 1955.

FAVA NETTO, C.; GUERRA, M.A.G.; COSTA, E.O. da & YASUDA, P.H. — Contribuição à sorologia da paracoccidioidomicose. Comparação entre reações de fixação do complemento pelas técnicas de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e micrométodo e reações de precipitação em meio líquido e gel de ágar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18:81-86, 1976.

2. FAVA NETTO, C. — Contribuição para o estudo da blastomicose de Lutz (Blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 21:99-194, 1961.
3. FAVA NETTO, C. — The serology of paracoccidioidomycosis: Present and future trends. Paracoccidioidomycosis. *Proc. First Pan Amer. Symp. Medellin* — Colombia PAHO-WHO pp. 209-213, 1972.
4. FAVA NETTO, C.; VEGAS, V.S.; SCIANNAMEA, I.M. & GUARNIERI, D.B. — Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11: 177-181, 1969.
5. LACAZ, C. da S., FERRI, R.G.; FAVA NETTO, C. & BELFORT, E. — Aspectos imunológicos da blastomicose sul-americana e blastomicose queiloideana (doença de Jorge-Lobo) *Med. Cir. Farm.* 298:63-74, 1962.
6. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.Y.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. — Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
7. MAEKELT, G.A. — Estudio sobre el valor de antígenos de *Histoplasma capsulatum* y de *Paracoccidioides brasiliensis* para el serodiagnóstico de estas micosis. *Arch. Venez. Med. Trop.* 3:149-160, 1960.
8. NEGRONI, R. — *Blastomycosis sudamericana en la Argentina*. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires, 1968.
9. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION — Manual of Standardized Serodiagnostic Procedures for Systemic Mycoses. Part. I. Agar Immunodiffusion Tests. Department of Research Development and Coordination. Washington DC 1972.
10. RESTREPO, A. — La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 4:223-230, 1966.
11. RESTREPO, A. & MONCADA, L.H. — Comportamiento inmunológico de veinte pacientes con paracoccidioidomycosis. *Antioquia Médica* 17:211-230, 1967.
12. RESTREPO, A. & MONCADA, L.H. — Serologic procedures in the diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Proc. Intern. Symp. on Mycoses PAHO*, 205 pp., 101-110, 1970.
13. RESTREPO, A. — La inmunodifusión en gel de ágar y la inmunofluorescencia en el diagnóstico de las micosis pulmonares. *Antioquia Médica* 22:337-345, 1972.
14. RESTREPO, A. & DROUHET, E. — Etude des anticorps précipitants dans la Blastomycose Sud-Américaine par l'analyse immunoelectrophoretique des antigens de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 119:338-346, 1970.
15. SMITH, C.E.; WHITING, E.G.; BAKER, E.E.; ROSEMBERG, H.G.; BEARD, R.R. & SAITO, M.T. — The use of coccidioidin. *Am. Rev. Tuberc.* (Abstracts) 57:330-360 1948.
16. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE — A Guide to the Performance of the Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test, 1969.
17. YARZABAL, L.A. — Anticorpos precipitantes específicos de la Blastomycosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:320-327, 1971.
18. YARZABAL, L.A.; TORRES, J.M.; JOSEF, M.; VIGNA, I.; da LUZ, S. & ANDRIEU, S. — Antigenic Mosaic of *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomycosis. *Proc. First Pan Amer. Symp., Medellin, Colombia PAHO-WHO*, pp. 239-244, 1972.

Recebido para publicação em 22/11/1974.