

## REAÇÕES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO EM GEL APLICADAS AO ESTUDO DO CALAZAR \*

ZAIR BENEDITA PINHEIRO \*\* OSWALDIRA SEABRÁ DE  
OLIVEIRA \*\*\* WILLIAM BARBOSA \*\*\*\*

### RESUMO

Soros de doze pacientes portadores de Leishmaniose visceral, comprovada parasitologicamente foram analisados através da técnica de eletroforese e de várias outras técnicas de imunoprecipitação em gel, tais como: imunoletroforese contra antisoro humano total e contra antisoro tríplice anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA; imunodifusão radial reversa para dosagem de imunoglobulinas; contra-imunoletroforese e imunodifusão dupla de Outcherlony.

A análise eletroforética revelou aumento de proteínas da zona gama, enquanto a imunoletroforese sugeriu que esse aumento corresse por conta da fração G.

A dosagem de imunoglobulinas demonstrou um aumento bastante significativo de IgG em todos os casos, e de IgM na maioria deles.

A contra-imunoletroforese se revelou um método de grande sensibilidade para detecção de precipitinas. Os mesmos soros positivos nesta reação, quando submetidos ao tratamento pelo mercapto-etanol não negativamente totalmente as linhas de precipitação, quando submetidos novamente à contra-imunoletroforese.

Através da imunodifusão clássica de

Outcherlony tentamos detectar antígenos circulantes, fazendo reagir soro contra soro, mas os resultados foram infrutíferos.

### INTRODUÇÃO

No Calazar, o diagnóstico parasitológico feito através de material obtido de punção de medula, de punção esplênica ou de fígado, embora ofereça segurança diagnóstica, nem sempre é positivo.

Os métodos de cultura e a inoculação em animais de experimentação em laboratório requerem cuidados e instalações especiais, e seus resultados são, muitas vezes, inconstantes.

Por outro lado, a detecção de anticorpos específicos por técnicas sorológicas "in vitro", como a Reação de Fixação de Complemento, a Hemaglutinação Passiva, a Reação de Aglutinação do Látex e a Imunofluorescência Indireta, sofre restrições impostas pelas próprias técnicas em si mes-

\* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical (IPT) da Universidade Federal de Goiás (UFGO.) — Realizado em parte como Trabalho do 1º Curso de Especialização em Imunologia e com ajuda financeira do C.N. Pq. (3554/72).  
\*\* Prof. Auxiliar de Ensino do Depto. de Parasitologia do IPT-UFGO.  
\*\*\* Estagiário Bolsista do Depto. de Microbiologia do IPT-UFGO.  
\*\*\*\* Prof. Titular do Depto. de Medicina Tropical do IPT-UFGO., e Chefe do Depto. de Medicina Tropical.

mas (7, 8, 21, 23). E quando se trabalha em áreas em que são comuns elevada prevalência de doenças produzidas por outras espécies de *Trypanosomatídeos*, ou de doenças devidas a micobactérias, essas limitações são muito ampliadas, (3, 10, 26).

Provavelmente, a reação de Imunofluorescência Indireta seria a melhor técnica para o diagnóstico e controle da leishmaniose visceral, não fôsse o componente subjetivo do método e a exigência de equipamento dispendioso, a par da dificuldade na padronização da técnica.

Parece-nos que estas dificuldades têm induzido vários pesquisadores a usar métodos de imunoprecipitação em gel, na tentativa de obter bons resultados diagnósticos para a leishmaniose visceral (18, 24, 6).

Além disso a sabida disproteinemia ocorrente no Calazar com seus elevados índices de globulinas, nos induziram ao estudo destas proteínas por técnicas qualitativas e quantitativas com as quais procuramos correlacionar os índices de precipitinas encontrados, evolutivamente.

O fato de trabalharmos em área onde a prevalência de Calazar aumenta dia a dia, nos levou a iniciarmos estudos neste campo, e neste trabalho estamos apresentando o que tem sido feito até o momento, (3, 19).

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### Antígenos:

A — *Leishmania donovani* — cêpa mantida desde 1970 no La-

boratório de Protozoologia do IPT, oriunda da Inglaterra e proveniente de Lisboa, em 1970.

B — *Leptomonas pessoai* — cêpa "principis" isolada no IPT por Galvão e cols. em 1969.

C — *Leishmania brasiliensis* — cêpa MT isolada no IPT, em 1970 durante uma epidemia ocorrida em Mato Grosso.

A técnica utilizada para a preparação de todos os antígenos foi a mesma. O antígeno constou de um extrato hidrossolúvel obtido da seguinte maneira: as formas promastigotas de cultura de três dias para *Leptomonas pessoai* e dez dias para as *Leishmanias brasiliensis* e *donovani*, foram cuidadosamente removidas da cultura e lavadas em salina tamponada por seis a sete vezes, depois ressuspendidas em solução de NaCl a 0.017 M., rôtas por congelamento e descongelamento por dez vezes, em seguida homogeneizadas em aparelho "Virtis" a 40 r.p.m. e depois liofilizadas. A massa liofilizada foi, então, diluída em salina na proporção de 1/4 volumes, e mantida em geladeira por uma noite, após centrifugação a 49C e a 20.000 g. por 1 hora. O sobrenadante foi usado como antígeno.

A concentração de proteínas de cada antígeno foi dosada pela técnica de Lowry. Antígeno de *L. donovani* = 1,79 mg/ml; *L. brasiliensis* = 2,63 mg/ml e *Leptomonas pessoai* = 3,26 mg/ml.

##### Anti-Sôros:

Anti-sêro humano total, obtido comercialmente dos Laboratórios

"Hyland". Anti-sêro anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA dos Laboratórios "Hyland".

##### Sôros:

Sôros de doze pacientes, num total de 67 amostras, colhidas evolutivamente, quase sempre com intervalo de uma ou duas semanas, durante cêra de dois meses de observação, em regime de internação.

Sôros Testemunhos para a Reação de Contra-Imunoeletroforese: 12 sôros de pacientes com Leishmaniose tegumentar estocados na soroteca do IPT.

12 sôros de pacientes com Tuberculose pulmonar, provenientes do Hospital de Tuberculose (Sanatório JK).

12 sôros de pacientes portadores de Doença de Chagas.

12 sôros de pacientes com Blastomicose Sul-Americana, pacientes em tratamento no Hospital das Clínicas, no Departamento de Medicina Tropical.

12 sôros de portadores de outras doenças: Jorge Lobo, Ancilostomose, Cromomicose, Malária, Actinomicose, Toxoplasmosse, Febre Amarela e Esquistosomose.

Sôros de Referência: IgG, IgM e IgA, obtidos comercialmente, dos Lab. Hyland.

##### Métodos:

As técnicas utilizadas foram:

1 — Dosagem de proteínas totais.

As proteínas totais foram dosadas pelo Método do Biuretto, segundo Gornal e cols. (17), utili-

zando um fotocolorímetro aus Jena.

2 — Eletroforese de Proteínas séricas:

A eletroforese foi feita sobre acetado celulose, em fitas "Cello-gel" de 2,5 cm. de largura por 14 cm. de comprimento, segundo a padronização clássica de Friedman, (16), adaptada por Vaz e cols. (31).

3 — Imunoeletroforese:

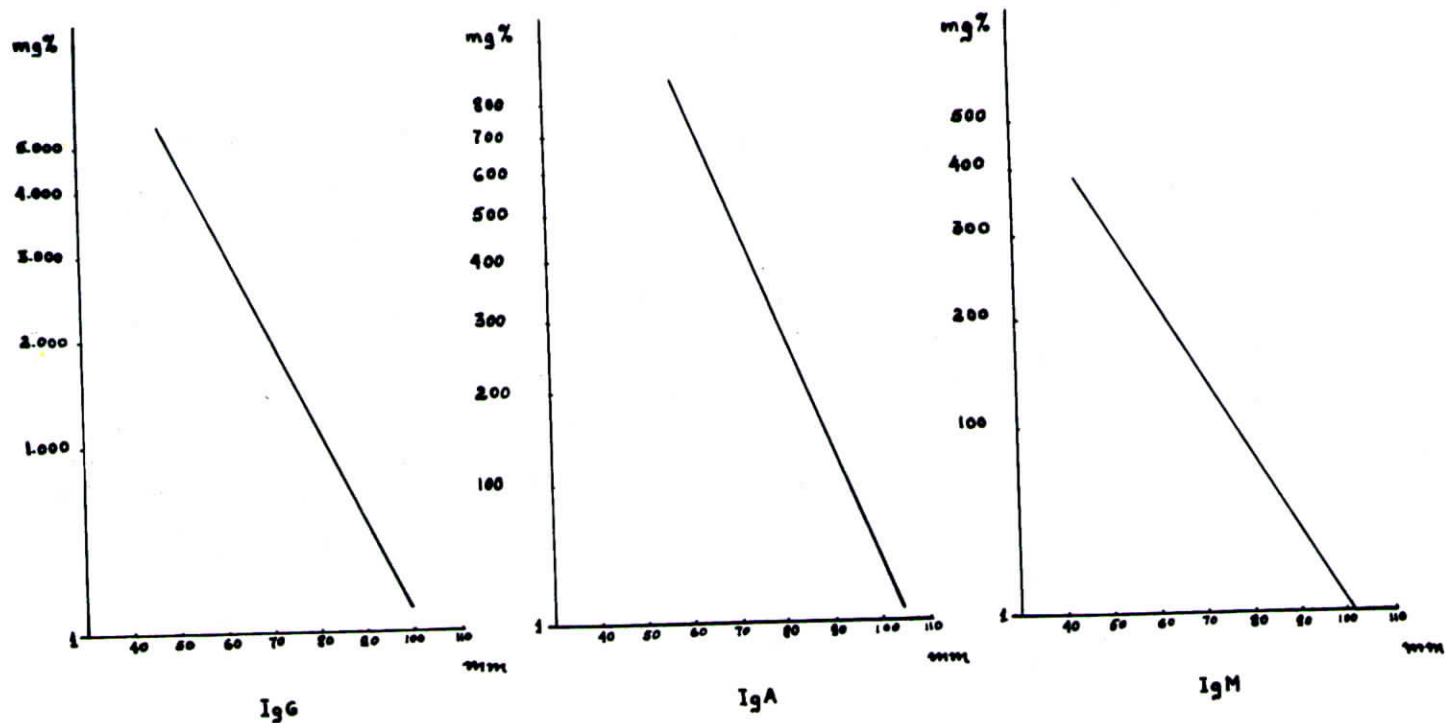
Constou de uma micro-técnica em lâminas de 75 mm x 25 mm. recobertas com 3 ml de ágar puro (Ionágar nº 2 — Oxoid) a 1% em solução de Tampão Veronal, pH 8.2. Na lâmina eram feitos dois orifícios de 3 mm. de diâmetro, entre os quais era aberta uma canaleta. No orifício superior era colocado um sêro humano normal e no orifício inferior, o sêro de Calazar. Fazia-se então, passar a corrente elétrica pelo tempo de 1 hora, com voltagem fixa de 200 volts., o que equivalia a cerca de 11mA por lâmina. Após a corrida eletroforética, colocava-se na canaleta o anti-sêro humano total ou o anti-sêro anti-IgG, anti-IgM ou anti-IgA e deixava-se difundir por 24 a 48 horas em câmara úmida, após o que eram observadas as faixas de precipitação (11). O equipamento utilizado foi um TM Electrophoresis Apparatus (Colab. Lab. Inc.).

4 — Dosagem de Imunoglobulinas:

Para êste objetivo foi usada a técnica de imunodifusão radical reversa em lâminas de ágar, tendo o anticorpo incorporado ao gel, técnica introduzida em nosso laboratório por Ayres (1) e poste-

# FIG. 1 CURVAS DE PADRONIZAÇÃO

Método: Imunodifusão Radial



riormente descrita por Antunes e cols (2).

Inicialmente, foram dosados sôros padrões de concentração conhecida, em várias diluições, com a finalidade de se encontrar uma diluição ideal e, estabelecer curvas de padronização.

As lâminas foram preparadas usando igual volume de ágar a 2% em solução fisiológica e de uma concentração ideal do sôro de referência: IgG a 1/300; IgA a 1/15 e IgM a 1/15. Deixava-se consolidar em temperatura ambiente e perfurava-se o ágar. No orifício de 3mm. de diâmetro colocava-se 10 microlitros de anti-sôro (anti-IgG, anti-IgM ou anti-IgA) e incubava-se por 24 horas para IgA e IgG e 48 horas para IgM.

A formação do complexo antígeno-anticorpo foi visualizado através de um anel de precipitação em torno do orifício onde era colocado o anti-sôro.

A correlação entre os diâmetros das áreas de precipitação e as concentrações forneceu uma reta em papel semi-logarítmico (fig. 1).

Dessa maneira foi determinada a concentração de imunoglobulinas dos sôros de Calazar.

A título de comparação fizemos algumas dosagens dos sôros utilizando "Imuno-plates Hyland", e outras técnicas clássicas de dosagem de imunoglobulinas (12,20) Para padrão usamos os dados de Antunes e cols. (2) que trabalharam com a mesma técnica e cujos resultados eram similares aos nossos em dez pacientes normais e bastante próximos dos de Pereira

e cols. (22) e dos de Takei e cols. (31):

#### 5 — Contra-imunoelectroforese:

Esta reação constou também de uma microtécnica em lâminas de microscopia comum de 75 mm x 25 mm. recobertas com 31 ml. de ágar a 1% em sol. de tampão veronal pH 8.2. Sobre o ágar eram feitos seis pares de orifícios, à distância de 3 mm. No orifício da esquerda, polo negativo, colocava-se o antígeno e à direita, polo positivo, colocava-se o sôro a testar (anticorpo). Fazia-se então passar a corrente elétrica, com voltagem fixa de 200 volts, o que equivalia a cerca de 11mA. por lâmina.

Todos os sôros foram estudados sem diluir ou concentrar, preliminarmente, contra cada um dos antígenos (*L. donovani*, *L. pessoai* e *L. brasiliensis*).

Posteriormente, os sôros de Calazar de todas as amostras disponíveis foram estudados diluídos nas proporções de 1/2 a 1/128, contra o antígeno homólogo.

#### 6 — Contra-imunoelectroforese após cisão de IgM com Mercapto-etanol:

Dos sôros de Calazar, dez foram submetidos ao tratamento pelo Mercapto-etanol, após o que foram novamente submetidos à reação de contra-imunoelectroforese.

#### 7 — Pesquisa de antígenos Circulantes:

Com esta finalidade foi usada a técnica de imunodifusão clássica de Outcherlony, fazendo-se reagir sôro contra sôro.

TABELA I

## ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS

Nº EXAME	PRONT.	DATA	NOME	PRE-ALBUMINA		ALBUMINAS		G L O B U L I N A S									
								ALFA 1		ALFA 2		BETA		GAMA		T O T A L	
				grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%
01	98.860	22.20.72	A.M.S.	-	-	2,13	28,47	0,15	2,07	0,23	3,14	0,48	6,46	4,51	59,86	7,50	100
02	96.860	28.03.72	A.M.S.	-	-	2,33	28,78	0,09	1,21	0,12	1,57	0,53	6,64	5,03	61,80	8,10	100
03	96.860	12.04.72	A.M.S.	-	-	2,43	29,55	0,17	2,16	0,27	3,39	0,67	8,13	4,71	56,77	8,25	100
04	96.860	27.04.72	A.M.S.	-	-	3,41	44,00	0,18	2,37	0,18	2,37	0,70	9,11	3,28	42,15	7,75	100
05	96.860	10.05.72	A.M.S.	-	-	3,20	42,75	0,20	2,75	0,24	3,33	0,71	9,55	3,15	41,62	7,50	100
06	96.860	18.05.72	A.M.S.	-	-	2,39	38,05	0,15	2,44	0,21	3,42	0,52	8,29	3,03	47,83	6,30	100
07	102.998	01.04.72	D.S.M.	-	-	2,08	45,34	0,15	3,31	0,50	10,95	0,39	8,51	1,48	31,89	4,60	100
08	102.998	08.04.72	D.S.M.	-	-	1,74	37,14	0,24	5,30	0,48	10,40	0,44	9,57	1,80	37,59	4,70	100
09	102.998	11.04.72	D.S.M.	-	-	1,81	40,36	0,16	3,56	0,35	7,87	0,35	7,87	1,83	40,34	4,90	100
10	102.998	18.04.72	D.S.M.	-	-	2,23	43,85	0,27	5,31	0,23	4,53	0,36	7,14	2,01	39,17	5,10	100
11	102.998	24.04.72	D.S.M.	-	-	2,48	47,32	0,22	4,20	0,28	5,49	0,52	9,96	1,75	33,03	5,25	100
12	102.998	16.05.72	D.S.M.	-	-	2,81	53,08	0,16	3,08	0,39	7,47	0,46	8,86	1,48	27,51	5,30	100
13	102.998	18.05.72	D.S.M.	-	-	2,97	46,49	0,24	3,85	0,45	7,17	0,68	10,75	2,03	31,74	6,40	100
14	102.998	26.05.72	D.S.M.	-	-	3,00	59,44	0,09	1,80	0,24	4,78	0,57	11,36	1,15	22,62	5,02	100
15	109.450	21.07.72	E.L.S.	-	-	2,18	32,32	0,27	4,05	0,48	7,22	0,48	7,22	3,35	49,19	6,75	100

TABELA I

## ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS

Nº EXAME	PRONT.	DATA	NOME	PRE-ALBUMINA		ALBUMINAS		G L O B U L I N A S									
								ALFA 1		ALFA 2		BETA		GAMA		T O T A L	
				grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%	grs%	%
16	109.415	20.10.72	E.L.S.	-	-	0,30	39,83	0,22	2,73	0,57	6,96	0,65	7,88	3,56	42,60	8,30	100
17	109.415	06.11.72	E.L.S.	-	-	2,67	43,86	0,11	1,86	0,40	6,57	0,56	9,28	2,36	38,43	6,10	100
18	109.415	08.12.72	E.L.S.	-	-	3,14	47,63	0,13	2,10	0,64	9,71	0,57	8,64	2,12	31,92	6,60	100
19	112.959	06.11.72	E.S.V.	-	-	1,54	24,10	0,21	3,38	0,42	6,57	0,32	5,15	3,91	60,80	6,40	100
20	112.959	20.11.72	E.S.V.	-	-	1,97	31,34	0,33	5,25	0,51	8,19	0,28	4,79	3,21	50,43	6,30	100
21	112.959	08.12.72	E.S.V.	-	-	4,07	50,97	0,24	3,11	0,54	6,79	0,71	8,96	2,44	30,17	8,00	100
22	112.959	03.01.72	E.S.V.	-	-	3,95	58,17	0,12	1,79	0,54	8,14	0,43	6,44	1,74	25,46	6,75	100
23	111.905	20.10.72	L:P.S.	-	-	2,90	35,06	0,65	7,87	0,19	2,38	0,39	4,77	4,17	49,92	8,30	100
24	903.607	22.03.72	M.P.C.	-	-	2,76	40,59	0,16	2,37	0,44	6,54	0,52	7,79	2,92	42,71	6,80	100
25	903.607	12.04.72	M.P.C.	-	-	3,29	44,49	0,10	1,47	0,37	5,13	0,31	4,28	3,33	44,73	7,40	100
26	903.607	10.05.72	M.P.C.	-	-	4,19	56,63	0,11	1,56	0,21	2,97	0,51	6,90	2,38	31,94	7,40	100
27	116.610	05.02.73	P.A.L.	-	-	2,58	32,95	0,23	2,97	0,19	2,43	0,25	3,25	4,60	58,40	7,85	100
28	116.610	13.02.73	P.A.L.	-	-	2,75	39,88	0,10	1,53	0,27	4,01	0,30	4,40	3,46	50,18	6,90	100
29	116.610	04.04.73	P.A.L.	-	-	2,14	39,71	0,09	1,85	0,13	2,58	0,15	2,95	2,89	52,91	5,40	100
30	116.610	11.04.73	P.A.L.	-	-	2,68	36,27	0,13	1,82	0,31	4,25	0,28	3,90	4,00	53,76	7,40	100



## RESULTADOS

1 — Os resultados da análise eletroforética acham-se contidos na Tabela 1, onde se pode observar um constante aumento de gamaglobulinas que variou de 22 a 61% e, em média estavam em torno de 45%. Observamos três casos de hiperproteinemia (PML, WCP e ANM) e um caso com hipoproteinemia (DSM).

2 — Os perfis imunoeletroforéticos revelaram aumento de gama-globulina migrando com ve-

contraste e morfologia das linhas de precipitação, somente em muitos poucos casos eram sugestivas de diminuição de concentração da fração M. (fig. 2).

3 — A dosagem de imunoglobulinas revelou acentuado aumento da fração G, muito embora as outras duas também se mostrassem alteradas. (Tabela II). As reações podem ser observadas na fig. 3. Os diâmetros maiores correspondem a IgA, os médios a IgG e os menores a IgM.

4 — Os resultados da reação

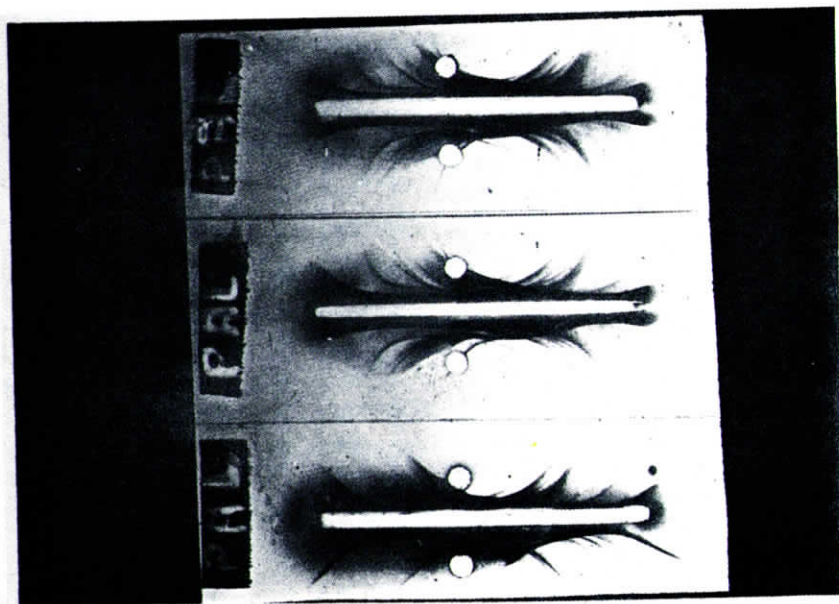


Fig. 2 — Sôros de pacientes com Calazar submetidos a Imunoeletroforese contra antígeno humano total.

locidade IgG na totalidade dos casos e alguns sugeriram discretas variações das linhas de precipitação interpretadas como aumento de IgM. Do ponto de vista evolutivo, as variações do tamanho,

de contra-imunoeletroforese estão resumidos nas tabelas III, IV, V e VI. Cabe observar que houve reações positivas com todos os três antígenos em proporções bastante elevadas: 96,9% com o an-



TABELA II

## DOSAGEM DE IgM, IgA, IgG EM SOROS DE CALAZAR

Nº	NOME	PRONTUÁRIO	DATA	IgA (mg%)	IgG (mg%)	IgM (mg%)
27	M.P.C.	903.607	22/03/72	390	3.420	168
28	M.P.C.	"	28/03/72	390	3.420	114
29	M.P.C.	"	03/04/72	330	3.000	156
30	M.P.C.	"	12/04/72	330	3.000	114
31	M.P.C.	"	10/05/72	420	3.000	135
32	P.A.L.	116.610	05/02/73	300	3.420	195
33	P.A.L.	"	13/02/73	180	2.700	180
34	P.A.L.	"	21/03/73	151	3.000	180
35	P.A.L.	"	30/03/73	97	2.040	168
36	P.A.L.	"	04/04/73	97	2.700	144
37	P.A.L.	"	11/04/73	97	3.420	180
38	P.A.L.	"	17/04/73	151	3.420	180
39	P.A.L.	"	24/04/73	142	2.700	180
40	P.A.L.	"	04/05/73	142	2.700	168
41	P.A.L.	"	08/05/73	112	2.040	135
42	P.M.L.	119.711	03/03/73	112	3.420	156
43	P.M.L.	"	04/04/73	-	2.700	180
44	P.M.L.	"	11/04/73	127	2.700	135
45	P.M.L.	"	17/04/73	80	3.420	114
46	P.M.L.	"	24/04/73	97	3.000	135
47	P.M.L.	"	30/04/73	80	3.000	97
48	P.M.L.	"	08/05/73	80	3.000	63
49	P.M.L.	"	16/05/73	85	3.000	-
50	P.M.L.	"	23/05/73	142	3.000	-
51	P.M.L.	"	30/05/73	88	3.000	63
52	S.M.R.	12.650	05/09/72	195	3.000	168
53	S.M.R.	"	20/09/72	195	3.000	180
54	S.M.R.	"	04/10/72	210	3.000	180
55	S.C.S.	110.206	19/09/72	450	2.700	78
56	S.C.S.	"	20/10/72	195	2.700	180
57	S.C.S.	"	06/11/72	210	2.700	195
58	W.C.P.	95.150	03/07/72	127	3.420	123
59	W.C.P.	"	17/07/72	300	3.420	144
60	W.C.P.	"	31/07/72	127	3.000	114
61	W.C.P.	"	- - -	151	2.700	195
62	G.F.S.	125.527	27/07/73	270	3.420	195
63	A.N.M.	126.675	04/10/73	240	3.780	105
64	A.N.M.	"	11/10/73	151	3.420	105
65	A.N.M.	"	20/10/73	151	3.420	105
66	A.N.M.	"	25/10/73	151	3.420	114
67	A.N.M.	"	31/10/73	112	3.000	114

TABELA II

## DOSAGEM DE IgA, IgM, IgG EM SÓROS DE CALAZAR

Nº	NOME	PRONTUÁRIO	DATA	IgA (mg%)	IgG (mg%)	IgM (mg%)
01	A.M.S.	96.860	22/03/72	195	3.000	-
02	A.M.S.	"	28/03/72	195	-	96
03	A.M.S.	"	03/04/72	151	2.700	-
04	A.M.S.	"	12/04/72	180	2.700	63
05	A.M.S.	"	27/04/72	255	2.700	63
06	A.M.S.	"	10/5/72	127	2.700	-
07	A.M.S.	"	18/5/72	127	-	-
08	D.S.M.	102.998	01/04/72	300	3.420	105
09	D.S.M.	"	08/04/72	330	-	114
10	D.S.M.	"	11/04/72	300	3.420	-
11	D.S.M.	"	18/04/72	270	3.000	114
12	D.S.M.	"	24/04/72	240	3.000	105
13	D.S.M.	"	03/05/72	210	3.000	-
14	D.S.M.	"	09/05/72	255	3.000	105
15	D.S.M.	"	16/05/72	240	-	78
16	D.S.M.	"	18/05/72	255	3.000	-
17	D.S.M.	"	26/05/72	240	-	96
18	E.L.S.	109.415	21/09/72	270	3.420	168
19	E.L.S.	"	20/10/72	255	2.700	144
20	E.L.S.	"	06/11/72	151	3.420	78
21	E.L.S.	"	08/12/72	180	3.420	123
22	E.S.V.	112.959	06/11/72	93	4.380	225
23	E.S.V.	"	20/11/72	270	3.420	168
24	E.S.V.	"	08/12/72	195	2.700	135
25	E.S.V.	"	20/12/72	195	2.700	78
26	E.S.V.	"	03/01/72	151	3.000	-

tígeno homólogo. O antígeno de **L. pessoai** foi o menos sensível e menos específico, e detectou oito dos doze casos (72,7%) e deu reações cruzadas com quatro casos de tuberculose e um de blastomicose. O antígeno de **L. brasiliensis** foi positivo em dez dos doze casos analisados (83,3%) e com os sôros homólogos não deu resultado positivo em nenhum. As reações podem ser observadas na fig. 4.

Quando fizemos reagir sôros diluídos nas proporções de 1/2 e

5 — De dez sôros positivos na reação de contra-imunoelectroforese, quando tratados pelo Mercapto-etanol e submetidos novamente à mesma reação, 2 não negataram inteiramente a reação, dando ainda faixas de precipitação. Tomamos, então, um destes sôros sem ser tratado pelo Mercapto-etanol e fizemos reagir contra IgM (anti-sôro). Obtivemos uma linha de precipitação muito nítida. Este mesmo sôro, então ao ser tratado pelo Mercapto-etanol foi novamente submetido à con-

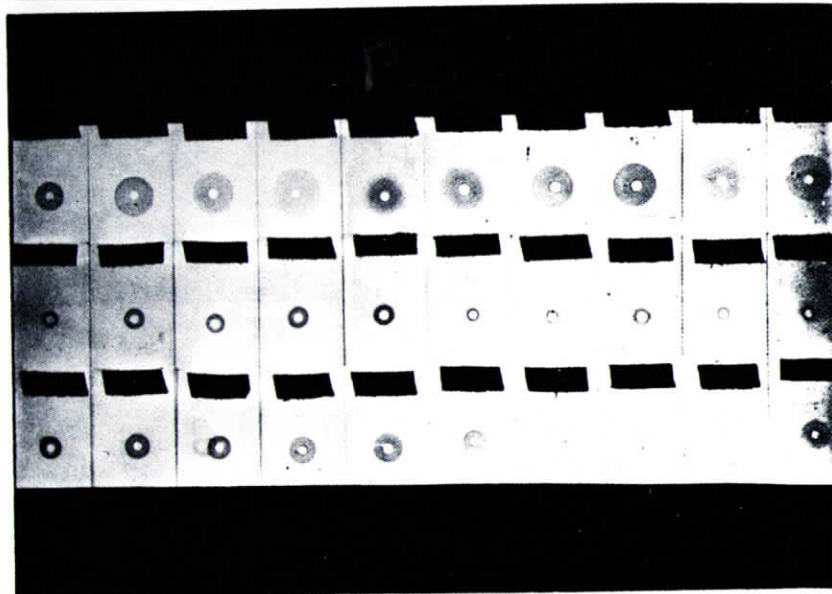


Fig. 3 — Imunodifusão Radial recersa para dosagem de Imunoglobulinas: IgG, IgM e IgA.

1/128 contra antígenos de **Leishmania donovani** algumas amostras negataram logo nas primeiras diluições. Algumas, entretanto, atingiram o título de 1/64 como se pode observar na tabela VI.

tra-imunoelectroforese com anti-IgM e desta vez não obtivemos linha de precipitação, fato este que nos levou a acreditar que o Mercapto-etanol estava realmente cindindo a cadeia de IgM.

TABELA III

RESULTADOS DA REAÇÃO DE CONTRA-IMUNOELECTROFORESE NOS SÔROS DE CALAZAR E TESTEMUNHOS COM ANTÍGENOS DE *L. donovani*, *L. brasiliensis* E *L. pessoai*

Doenças	Calazar		Tuberculose		L. tegumentar		D. Chagas		B.S.A.		Outras	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
<i>L. donovani</i>	12	0	0	12	0	12	0	12	0	12	0	8
<i>L. brasiliensis</i>	11	1	0	12	0	12	0	12	0	12	0	8
<i>L. pessoai</i>	08	4	4	08	0	12	0	12	1	11	0	8

Obs.: P= Positivo, N= Negativo

TABELA IV

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE CONTRA-IMUNOELECTROFORESE COM OS 3 ANTÍGENOS CONTRA SÔROS SABIDAMENTE POSITIVOS OU NEGATIVOS.

Doença Resultado	Calazar (Amostras Positivas)			Outras doenças (Amostras Negativas)		
	Nº Abs.	P	(%)	Nº Abs.	P	(%)
<i>L. donovani</i>	66	64	96,9	56	0	0
<i>L. brasiliensis</i>	12	10	83,3	56	0	0
<i>L. pessoai</i>	12	08	66,6	56	5	8,9

TABELA V

ESTUDOS DOS SÔROS DE CALAZAR (SEM DILUIR) EM CONTRA-IMUNOELECTROFORESE COM ANTÍGENOS DE *L. donovani*, *L. brasiliensis* e *L. pessoai*

Nº e iniciais	ANTÍGENOS								
	<i>L. donovani</i>			<i>L. brasiliensis</i>			<i>L. pessoai</i>		
	Nº de amostras	Resultados Positivos	Nº de faixas	Nº de amostras	Resultados Positivos	Nº de faixas	Nº de amostras	Result. Posit.	Nº de faixas
1-AMS	07	07	01	01	01	02	01	01	02
2-DSM	10	09	01	01	01	02	01	01	02
3-ELS	04	03	02	01	01	02	01	-	-
4-ESV	05	05	01	01	01	03	01	-	-
5-MPC	05	05	01	01	-	-	01	-	-
6-PAL	10	10	01	01	01	03	01	01	03
7-PML	10	10	01	01	01	02	01	01	02
8-SMR	03	03	01	01	01	03	01	01	03
9-SCS	03	03	01	01	-	-	01	-	-
10-WCP	03	03	01	01	02	01	01	01	02
11-GFS	01	01	01	01	01	01	01	01	02
12-ANW	05	05	02	01	01	03	01	01	03
Total	66	64		12	10		12	08	

TABELA VI

ESTUDOS DOS SÔROS DE CALAZAR DILUÍDOS NAS PROPORÇÕES DE 1/2 A 1/128 EM CONTRA-IMUNOELETROFORESE CONTRA ANTÍGENO DE L. donovani

Resultado Nome	A M O S T R A S									
	1. <sup>a</sup>	2. <sup>a</sup>	3. <sup>a</sup>	4. <sup>a</sup>	5. <sup>a</sup>	6. <sup>a</sup>	7. <sup>a</sup>	8. <sup>a</sup>	9. <sup>a</sup>	10. <sup>a</sup>
A.M.S.	1/8	1/16	N	N	1/32	1/32				
D.S.M.	1/8	1/16	1/8	1/8	1/4	1/2				
E.L.S.	1/4	N	N	N						
E.S.V.	N	N	N	N						
M.P.C.	1/64	1/64	1/64	1/64						
P.A.L.	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64
P.M.L.	1/64	1/64	1/64	1/8	1/8	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
S.M.R.	N	N	N							
S.C.S.	-	1/64	N							
W.C.P.	1/4	1/8	1/16							
G.F.S**	1/32									
A.N.M.	1/64	1/64	1/64	1/64	1/32					

N =Negativo

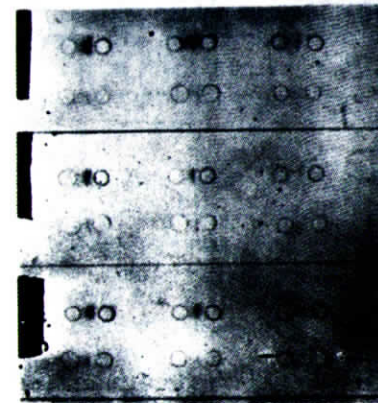
\*\* =Óbito após dois dias de internação

#### COMENTÁRIOS

Dentre os sôros estudados, observamos a ocorrência de hipoproteinemia em um caso (DSM)

que apresentou, no entanto, percentagem de gamaglobulina da ordem de 31,89% e que evolutivamente normalizou seu quadro proteico no decurso de 50 dias.

Fig.4



Observamos que a IgG estava aumentada em todos os doze pacientes estudados, em suas sessenta e seis amostras de sôro não havia nenhum com taxa normal de IgG ou com diminuição dessa imunoglobulina. Em quatro casos (MPC, ESV, PAL e WCP), verificamos considerável aumento na primeira amostra e uma sensível diminuição desta para a última, diminuição esta que ocorreu na ordem de 1.380, 1.380, 720 e 720 mg%, respectivamente, embora as últimas amostras continuassem com taxas muito elevadas.

Quanto a imunoglobulina IgM, dosada em 57 amostras de sôros, se mostrou aumentada em 48, normal em 12 e ligeiramente diminuída em 4. Manteve-se constantemente aumentada em quatro doentes no decurso da observação (MPC, PAL, SMR e WCP).

Em dois casos (ESV e PML) houve normalização dos índices nas últimas amostras; nos cinco demais pacientes os índices de IgM mostraram-se normais ou ligeiramente aumentados, em um deles aliás, (AMS) 3 determinações nunca revelaram taxa acima do normal.

A imunoglobulina IgA dosada em 66 amostras de sôro se mostrou absolutamente normal em 41 amostras, ligeiramente diminuída em 18, ligeiramente aumentada em cinco e com aumento considerável em duas amostras. Apenas dois pacientes (MPC e SCS) apresentaram esta imunoglobulina em taxas aumentadas, aquele em cinco amostras com intervalos semanais e o último (SCS) somente na primeira amostra.

As reações de contra-imunoeletróforese com os três antígenos confirmaram a existência de componentes antigênicos comuns entre as *Leishmanias donovani* e *brasilensis* e *Leptomonas pessoai*, referidos por Sousa e cols. (30).

O antígeno homólogo, embora se mostrasse como o mais sensível e mais específico, deu geralmente uma faixa de precipitação, enquanto que os outros antígenos mostraram duas ou três faixas de precipitação quando postos a reagir com os sôros de Calazar sem diluir.

A reação de contra-imunoeletróforese quantitativa guardou relação com o quadro clínico, o que será motivo de próxima comunicação.

Analisada, puramente do ponto de vista laboratorial, em pacientes em tratamento, ela se com-

portou de maneira diversa: em dois casos (ESV e SMR) nas primeiras amostras já se mostrou negativa, assim permanecendo nas outras e em todas as diluições. Em um caso (AMS) embora positiva em títulos diferentes na primeira e segunda amostra, foi negativa na terceira e quarta, positivando-se na quinta e sexta. Em outros pacientes observamos a tendência a um queda progressiva e paulatina dos títulos (DSM e PML), pacientes observados mais longamente, e também no caso do paciente ANM observado apenas durante um mês. Em outros dois casos (MPC e PAL) acompanhados por cerca de três meses verificou-se a estabilização dos títulos de precipitinas, embora em um dos casos surpreendêssemos duas amostras consecutivas, negativas (3ª. e 4ª).

A análise destes dados sugerem não haver nítida correlação entre os títulos de imunoglobulinas IgG e os títulos de precipitinas determinado por diluições sucessivas pela técnica de contra-imunoelektroforese, no Calazar, pois observamos tanto reações negativas como positivas em diluições altas, indiferentemente, em pacientes com altas taxas de imunoglobulina G. Este fato poderá ser explicado como ocorre na malária por *Plasmodium falciparum* e, com muito mais razão, porque a estimulação do SRE excita não só a produção de imunoglobulinas específicas, mas também IgG inespecífica.

Também não observamos correlação entre os títulos de anticorpos 19S e os valores da contra-

imunoelektroforese, de maneira absoluta. Observamos, é verdade, taxas de IgM elevadas, inicialmente, com evolução para a normalização, como em um paciente (ESV) em que todas as reações de contra-imunoelektroforese, após diluições foram negativas, e também casos, como do paciente (MPC) com títulos elevados, ainda que moderado de IgM em que a reação de contra-imunoelektroforese revelou sempre títulos elevados de precipitinas, na ordem de 1/64, o mesmo acontecendo com o paciente (PAL). Também, pacientes que evoluíram com títulos de IgM dentro da normalidade como (DSM) em que a imunoelektroforese pareceu bastante concordante com aqueles títulos. Houve ainda aparente concordância entre a evolução dos títulos elevados de IgM e da contra-imunoelektroforese no paciente PML.

Em contrapartida, pudemos observar também casos como do paciente (SMR) que em 3 amostras consecutivas, com taxas elevadas de IgM e com reações de contra-imunoelektroforese, em diluições de 1/2, completamente negativas.

Esses dados parecem sugerir e podem ser explicados pela existência, no Calazar, de anticorpos do tipo 7S e 19S mesmo durante a evolução da doença, aliás, como já havia sido verificado por Ferri (13) e Chaves e Ferri (9).

Visando melhor esclarecimento sobre o assunto, procedemos à cisão pelo Mercapto-etanol dos anticorpos 19S de amostras de dez sôros. Pudemos, então, verificar que, na reação de contra-imunoelektroforese, dois pacientes não negativaram a reação após o

tratamento, ocorrendo apenas o desaparecimento de uma das faixas. Os outros oito sôros tiveram o desaparecimento total da faixa de precipitação.

Estes experimentos são sugestivos de que realmente ambos os anticorpos 7S e 19S estejam implicados na precipitação que ocorre na reação de contra-imunoelektroforese, e o mais das vezes depende de IgM. Fato que, naturalmente, merece confirmação.

#### SUMMARY

#### REACTIONS OF GEL PRECIPITATION APPLIED TO STUDY OF CALAZAR

Sera from twelve patients with visceral leishmaniasis, confirmed by parasitologic examination and under clinical control were studied by electrophoresis and several techniques of gel precipitation as: immunoelectrophoresis against human anti-serum; anti-IgG, anti-IgM and anti-IgA anti-serum; reverse immunodiffusion for immunoglobulins quantitation; counter-immunoelectrophoresis and Outchertony immunodiffusion.

Electrophoretic analyse showed increasing gama-proteins, while immunoelectrophoresis suggested this increasing was by IgG fraction.

Immunoglobulins quantitation demonstrated meaning increasing of IgG in all cases, and IgM in several one.

Counter-immunoelectrophoresis revealed technique with high sensitivity for detection of precipitins. Positive sera in this reaction were treated by mercapto-etanol and didn't negated a new reation, intirely.

By classic Outchertony immunodiffusion we attempted to detect circulating antigen, but the results were infectual.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 — ANTUNES, J. L.; REIS, P. A.; TAVARES, A. C. & KATZ, N. — Im-

munoglobulins in Human Schistosomiasis mansonii — J. of Par. Vol. 57, 3, 1971.

- 2 — AYRES, W. F. — Imunodifusão Radial Reversa para Titulação de Imunoglobulinas no Soro. Trabalho apresentado ao 9º. Cong. Bras. de Alerg. e Imunopat. — Rio de Janeiro, 1969.
- 3 — AFCHAIN, D.; LE REY, D.; CAPRON, A. & JADIN, J. — Analyse antigenique comparée par immunoelectrophores des formes de culture de Trypanosoma (Trypanozoon) brucei et L. donovani. Consequences phylogéniques et diagnostiques. J. Prot. 19 (Suppl.); 59-60, 1972.
- 4 — BARBOSA, W.; BLAU, E.; MENDONÇA, J. R. & OLIVEIRA, R. L. — Crossing-over immunoelectrophoresis applied to study of immunology of South American Blastomycosis — Previous Note — Rev. Pat. Trop. (2): 1, 73-76, 1973.
- 5 — BARBOSA, W. — Subsídios ao Estado do Calazar em Goiás — Rev. Goiana Med. 12: 3-26, 1969.
- 6 — BARBOSA, W.; PINHEIRO, Z. B. & OLIVEIRA, R. L. — Eletroimunodifusão no diagnóstico do Calazar com os antígenos de *L. donovani*, *L. brasiliensis* e *L. pessaoui*. — Resultados Preliminares — Rev. Pat. Trop. (2): 4, 377-386, 1973.
- 7 — BRAY, R. S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis I. The fluorescent antibody staining technique. Trans. R. Soc. Med. Hyg. 59: 535-544, 1965.
- 8 — BRAY, R. & LAINSON, R. — Studies on the immunology and serology of leishmaniasis V. The use of particles as vehicles in passive agglutination test. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 61, 490-505, 1967.
- 9 — CHAVES, J. & FERRI, R. G. — Imunoglobulinas in visceral leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8: 225-226, 1966.
- 10 — CHANG, S. L. & NEGHERLON, W. O. — Studies on Hemoflagellates III. The specificity of serological reactions of *L. donovani*, *L. brasiliensis*, *L. tropica* e *T. cruzi*. — J. Inf. Dis. 81, 209-227, 1947.
- 11 — CROWLE, A. J. — Immunodiffusion — Academic Press — Second Edition — 305-352, 1973.
- 12 — FAHEY, J. L. & MCKELVEY, E. M. — Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar-plates. J. Immun. 84-94, 1965.
- 13 — FERRI, R. G. — Natureza dos anticorpos nas diversas fases de imunização e Propriedades dos fragmentos mono e bivalentes. Tese de doutoramento. Depto. de Microb. e Immun. Fac. Med. Univ. São Paulo, 1967.
- 14 — FIFE, E. H. — Current state in serological test used to detect blood parasitic infection. Exp. Parasit. 30: 132-152, 1971.
- 15 — FIFE, E. H. — Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases. Exp. Parasit. 1-30: 132-152, 1971.
- 16 — FRIEDMAN, H. S. — Standardized

- Procedure for Serum Protein Electrophoresis on Acetate Cellulose Membrane Strips Clin. Chim. Acta, 6, 775-781, 1961.
- 17 — GORNALL, A. G.; BARDWIL, C. J. & DAVID, M. M. J. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-756, 1949.
- 18 — LE REY, D.; AFCHAIN, D.; JADIN, J.; CAPRON, A.; YASAROL, S.; LANOTTE, G. & FAMEERE, L. — Diagnostic immunoelectrophoretic de la leishmaniose viscerale a l'aide d'un antigeno hidrossoluble de *L. donovani*. Results Preliminaires. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 53, 1, 31-41; 1973.
- 19 — MANCINI, G.; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. — Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2, 235, 1965.
- 20 — MANCINI, G.; VAERMAN, J. P.; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. — A single radial diffusion method for immunological quantitation of Proteins. In the XI Colloquium on Protides of the Biological Fluids. H. Peters. Ed. Elsevier - Amsterdam . 300, 1964.
- 21 — MAYRINK, W.; ARAÚJO, F. G. & MAGALHÃES, P. A. — Fluorescent antibody in visceral leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 9, 172-174, 1967.
- 22 — PEREIRA, L. M.; CALLADO, A. N. A.; CONSTÂNCIO, W. F.; LAJCHTER, D. & VIEIRA, A. A. — Determinação Quantitativa de Imunoglobulinas (Imunodifusão Radial). Rev. Med. Est. Guanab. 38 (2): 153-161, 1971.
- 23 — QUILICI, M.; DUNAN, S. — L'immunofluorescence dans les leishmanioses. Comparison avec la reaction de Fixation du Complement. Rev. Med. Trop. 28, 37-43, 1968.
- 24 — RANQUE, J. & DUNAN, S. — Reactions on d'immunoprecipitation en gelose dans les leishmanioses. Rev. Med. Trop. 29, 70-75, 1969.
- 25 — RANQUE, J. & DUNAN, S. — Comportament antigenique de divers flagellés au cours des leishmanioses cliniques et experimentales. Ann. Parasit. 39, 117-130, 1964.
- 26 — RANQUE, Ph & QUILICI, M. — Parantés antigenique entre *L. donovani* e *Mycobacterium phlei* — J. Protoz. 18 — Supply 50.
- 27 — REZENDE, J. M.; SANTANA, E.; DOLES, J. & BORGES, C. — Calazar em Goiás — Rev. Goiana Med. 9: 131-140, 1963
- 28 — SAN GUPTA, P. C.; — Immunodiagnosis of Kalazar. Rev. Soc. Med. Trop. Hyg. 63-143, 1969.
- 29 — SCHNEIDER, W. & BERNDT, H. — Immunoelectrophoresis, Método e Atlas. Editorial Médica Pan-Americana. S/A. Buenos Ayres, 1973
- 30 — SOUSA, M. C. M. & BARBOSA W. — Immunological relationship between "*Leptomonas pessoai*" (strain princips), *Crithidia fasciculata*, *Leishmania brasiliensis* and *T. cruzi* by the ágar gel diffusion technique. Previous Note. Rev. Pat. Trop. (1): 4, 415-419, 1972.
- 31 — VAZ, C. A. C.; FERRI, R. G.; GEISDHOVEL, N. & CAMPOS, A. N. — Eletroforese sobre Acetato de Celulose (CAF). Reprodutibilidade e Valôres Normais. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 31: 71-75, 1971.
- 32 — TAKEY, K.; FERRI, R. G.; CALISH, V. L. G.; MELO, E. & SILVA, M. L. R. — Quantificação de Imunoglobulinas. Determinação da Faixa de Normalidade. Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo, 15 (6), 399-408, 1973.