

## VALOR DE UM ANTÍGENO DE *S. mansoni* ADULTO PARA AS REAÇÕES DE IMUNOFLORESCÊNCIA EM LÂMINA. \*

HILDA MARIA FRANCO \*\* PALMIRA C. ROMBERT \*\*\* MARIA AMÉLIA MARTINS \*\*\*\*

### RESUMO

Os autores empregaram como antígeno, os fragmentos de *S. mansoni* adulto, fresco, para reações de Imunofluorescência indireta em lâmina.

O método revelou-se de fácil execução, sendo perfeita a aderência do antígeno às lâminas.

Os resultados obtidos com sangue, colhido em papel de filtro de animais infectados experimentalmente e de animais normais, deram lugar a 98,6% de positividade, sem nenhuma reação falsa positiva.

### INTRODUÇÃO

As reações de imunofluorescência foram introduzidas por Jackson (1959) no estudo da imunologia das helmintíases, e desde então a sua aplicação estendeu-se a todo esse ramo da Parasitologia.

Sadun e cols., em 1960, usando cercárias como antígeno, fo-

ram os primeiros a aplicar a técnica de imunofluorescência, para diagnóstico da bilharziose; esta técnica foi depois largamente empregada por outros estudiosos do assunto.

Camargo e cols., em 1965, desenvolveram uma técnica de imunofluorescência em que usaram pela primeira vez, como antígeno, fragmentos do verme adulto (*S. mansoni*), em lâmina.

Os vermes eram previamente liofilizados, dislipidizados, secos, suspensos em tampão salina (P. B.S.) e por fim colocados em áreas diversas das lâminas. Os autores verificaram a simplicidade e economia do método, obtendo 95,6% de positividade e 0% de reações falsas positivas.

Viguelloux e cols., em 1969, usaram técnica semelhante, com algumas modificações e fizeram controle de título durante o tra-

\* Trabalho realizado na Cadeira de Entomologia e Helmintologia (Prof. J. Fraga de Azevedo) da E.N.S.P.M.T., Lisboa.

\*\* Bolsista do Ministério do Ultramar; Biologista na Organização de Saúde do Estado de Goiás (Brasil).

\*\*\* Assistente da E.N.S.P.M.T. de Lisboa.

\*\*\*\* Assistente da E.N.S.P.M.T. de Lisboa.

tamento da doença em alguns pacientes; mais tarde (1971) estudando ainda a mesma técnica chegaram à conclusão que não há correlação entre a taxa de anticorpos e a eliminação de ovos na urina.

Também Coudert e cols, em 1967 empregaram pela primeira vez cortes de congelamento de *Schistosoma mansoni* adulto, como antígeno, a partir de fígado de ratinhos infectados e os autores conseguiram 96,2% de positividade.

Em 1967, um de nós (P.R.) descreveu uma técnica de imunofluorescência em lâmina em que usava como antígeno o triturado do hepatopâncreas do molusco que continha formas larvares do verme. O método mostra-nos a sensibilidade (96%) e especificidade satisfatória da reação, que no entanto, ocasionava uma perda importante de moluscos infectados.

Baseados na necessidade de uma técnica mais econômica e consequentemente de mais fácil aplicação em laboratórios de rotina clínica, experimentamos um novo método de reação de imunofluorescência indireta, em lâmina, em que empregamos fragmentos de vermes adultos frescos (*S. mansoni*).

Como os resultados que conseguimos foram bastante satisfatórios, vimos descrever a técnica usada que nos parece corresponder aos desígnios desejados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Antígeno

Os camundongos (*Mus musculus*) estirpe Rockfeller, mantidos neste Instituto há 17 anos, foram infectados, por imersão da cauda, em água contendo 230 cercárias por animal, durante 60 minutos. As cercárias foram obtidas pela exposição à luz de moluscos (*Biomphalaria pfeifferi*) originários da Katanga, infectados por *Schistosoma mansoni* da Tanzânia, amavelmente cedidos pelo Dr. Mandhal Barth da Dinamarca.

Os camundongos foram sacrificados 2 1/2 meses após a infecção.

Por dissecação das veias mesentéricas e sistema porta obtivemos os vermes adultos.

Estes vermes foram lavados cuidadosamente em solução fisiológica e guardados em água destilada, no congelador.

Com os devidos cuidados separamos mais ou menos 40 vermes (machos e fêmeas) e em um almofariz de porcelana trituramos até obtermos fragmentos necessários para reações de imunofluorescência.

Diluímos o triturado a fim de obtermos 8 a 9 fragmentos por campo microscópico; colocamos no congelador; o antígeno assim obtido preparado e guardado em frasco bem fechado, permanece durante meses sem perda das propriedades antigênicas.

### Soros

Foram examinados 176 amostras as quais dividiremos do seguinte modo:

#### 1 - Camundongos

a) 87 eluatos de sangue com infecção experimental por *S mansoni* (guardados no congelador)

b) 20 eluatos de sangue sem possível infecção (também guardados no congelador).

#### 2 - Humanos

a) 25 soros de bilharziose do Brasil e Guiné (soros de 1 até 3 anos guardados no congelador).

b) 4 soros positivos para fasciolíase

c) 5 soros positivos para quisto hidático

d) 10 eluatos de sangue, sendo 9 possivelmente negativos para bilharziose e 1 positivo.

e) 10 soros negativos

#### 3 - Cães

a) 8 soros positivos para ancilostomíase

b) 2 soros negativos

#### 4 - Rato (*Rattus rattus*)

5 soros positivos para triquinose.

### Método:

As lâminas foram preparadas para disporem de 10 campos de leitura, sendo 5 superiores e 5 inferiores; esses campos foram separados através de traços obtidos por lápis diamante.

O motivo foi evitar a mistura dos soros ou diluições.

Em cada campo foi colocado com pipeta Pasteur um gota do antígeno e imediatamente aspirado; levamos a lâmina à lupa entomológica a fim de assegurarmos da quantidade do antígeno.

As lâminas assim preparadas foram secas em estufa a 37°C, por 60 minutos; logo foram colocadas em caixa de vidro, tão isoladas da umidade quanto possível e guardadas no congelador até o momento do uso.

Todos os sangues foram colhidos em papel Canson 435 e cuidadosamente identificados; além da especificação, no caso dos camundongos, da quantidade de vermes encontrados, estes foram numerados e datados.

Os papéis contendo o sangue, depois de secos à temperatura ambiente, foram guardados em sacos plástico, herméticamente fechados pelo calor, de modo a não absorver, absolutamente, nenhuma humidade. Esses sangues colhidos em papel, guardados no congelador, conservam os anticorpos inalterados pelo menos até 60 dias.

Para efetuarmos as reações adotamos o seguinte critério:

1) — Depois de retiradas as lâminas do congelador, deixamos secar naturalmente à temperatura de 20°C; fixamos as mesmas em acetona durante 10 minutos.

2) — Os soros foram utilizados em várias diluições: assim, os de bilharziose e fasciolíase foram

diluídos de 1/10 até 1/80, e os restantes foram empregados apenas em duas diluições, 1/10 e 1/20.

3) — Quanto ao sangue colhido em papel absorvente, foi usado em eluato, conseguido por meio de solução tampão de fosfato, pH 7.2:

Para conseguirmos esse eluato procedemos do seguinte modo:

Com auxílio de um perfurador, fizemos círculos de 5mm de diâmetro, bem no centro da mancha sanguínea. Cada um destes círculos foi colocado sobre uma preparação antigênica e com pipeta Pasteur foi deitada uma gota do referido tampão sobre o mesmo.

4) — Quanto às diluições dos soros, procedemos da mesma maneira, colocando uma gota de cada diluição sobre uma preparação antigênica.

5) — As lâminas assim preparadas foram levadas para estufa a 37°C; em câmara úmida, durante 30 minutos. (\*)

6) — Em seguida, lavamos as lâminas em tampão de fosfato 0.01M de pH 7.2 (P.B.S.), por duas vezes, 5 minutos cada lavagem; secam-se à temperatura ambiente.

7) — Usamos para cada caso, a respectiva globulina marcada, na diluição de 1/20 e para contra colaração, o Azul de Evans 1/10.000.

(\*) Para os eluatos houve uma variação no tempo para mais 30 minutos a fim que se desse a diluição do sangue.

8) — A montagem da lâmina para a leitura, foi feita com glicerol tamponado e lamínulas redondas para cada campo.

As leituras foram feitas em microscópio Zeiss de luz ultravioleta obtida de uma lâmpada Osram HBO 200. Como filtros de excitação usamos BG.2, I e II e como barreira os 50 e 47 ou seja OG4 e, GG4.

As reações foram consideradas positivas, quando os fragmentos do verme apresentavam fluorescência amarela esverdeada tornando a cor vermelha conferida pelo Azul de Evans, que é a coloração de fundo. Nos casos negativos todos os fragmentos apresentavam coloração vermelha exceto a fluorescência apresentada pelas glândulas vitelinas, cuja coloração absolutamente diferente, portanto **inespecífica**.

## RESULTADOS

Os resultados foram analisados separadamente:

### 1 — Sangue colhido em papel

Nos camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni*, mesmo aqueles em que não foi encontrado na autópsia nenhum verme, encontramos reação fortemente positiva (—|—|—|—).

Dentre os 87 camundongos examinados com 2-1/2 meses de infecção, apenas um deu reação negativa.

Devemos no entanto, acrescentar que neste último não foi encontrado também nenhum verme. Considerando este, como ne-

TABELA I

Resultado das R.I.F. em lâmina, em fragmentos de *S. mansoni* adulto e eluatos de sangues diversos

| Eluatos                         | N.º | R E S U L T A D O |      |           |
|---------------------------------|-----|-------------------|------|-----------|
|                                 |     | Posit.            | Duv. | Neg. % P. |
| CAMUNDONGOS                     |     |                   |      |           |
| Infectados c/ <i>S. mansoni</i> | 87  | 86                | 0    | 1 98,6    |
| Sem Infecção                    | 20  | 0                 | 0    | 20 0      |
| HUMANOS                         |     |                   |      |           |
| C/bilharziose                   | 1   | 1                 | 0    | 0 —       |
| S/bilharziose                   | 10  | 0                 | 2    | 8 —       |

gativo podemos afirmar que houve 98,6% de positividade.

O eluato de sangue humano de um doente confirmado de Bilharziose vesical, deu resultado positivo, enquanto que os 10 eluatos de sangues, sem possível Bilharziose deram lugar a 8 reações negativas e duas consideradas duvidosas por se terem encontrado alguns fragmentos com fluorescência, embora outros não a apresentassem. (Tabela I).

### 2 — Soros

Dentre os 25 soros de bilharziose examinados, somente um soros era recente, os demais estavam de 1 a 3 anos guardados no refrigerador. Dos soros antigos tivemos apenas duas reações positivas, uma delas até dil. 1/40 e a outra, até diluição 1/20 e duas reações duvidosas. O soro

colhido recentemente de um doente com reação positiva até diluição 1/40 e fracamente positiva a 1/80. Neste mesmo doente foi examinado o eluato de sangue que é o referido anteriormente.

Os 10 soros humanos sem possível bilharziose deram todas as reações negativas.

Foram examinados ainda 4 soros humanos positivos para fasciolíase, todos recentemente colhidos, os quais deram lugar a reações negativas.

Dentre os 5 soros humanos positivos para quisto hidático, tivemos uma reação duvidosa e os demais foram negativos.

Com 8 soros de cães positivos para ancilostomíase, colhidos há 3 meses obtivemos também reações negativas assim como com os 2 soros de cães sem parasitoses.

TABELA II

Resultado das R.I.F. em lâmina com fragmentos de *S. mansoni* adulto e diversos soros.

| Características Soros | R E S U L T A D O |        |      |      |    |
|-----------------------|-------------------|--------|------|------|----|
|                       | N.º               | Posit. | Duv. | Neg. |    |
| <b>HUMANOS</b>        | Bilharziose       | 25     | 3    | 2    | 20 |
|                       | Fasciolíase       | 4      | 0    | 0    | 4  |
|                       | Q. Hidático       | 5      | 0    | 1    | 4  |
|                       | Normais           | 10     | 0    | 0    | 10 |
| <b>CÃES</b>           | Ancilostomíase    | 8      | 0    | 0    | 8  |
|                       | Normais           | 2      | 0    | 0    | 2  |
| <b>RATOS</b>          | Triquinose        | 5      | 0    | 0    | 5  |

Os 5 soros de ratos positivos para Triquinose, colhidos recentemente, deram também lugar a reações negativas (Tabela II).

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados que podemos observar pelas tabelas I e II demonstram-nos que a reação se revelou muito mais sensível quando efetuada com eluatos de sangue colhido em papel absorvente do que com soros.

Atribuímos este fato a que os eluatos pertenciam a animais infectados experimentalmente e tinham sido colhidos recentemente (60 dias), enquanto os soros de bilharziose tinham sido conservados em frigorífico de 1 a 3 anos.

Quanto à especificidade, a reação mostrou-se igualmente valiosa tanto com soros, como com eluatos de sangue.

Devemos assinalar que todos os soros de fasciolíase e quisto hidático eram recentes e pertenciam a infecções naturais e que os soros de ancilostomíase e triquinose eram de animais infectados experimentalmente e conservados há pouco tempo no frigorífico (2 meses).

Efetuamos experiência para verificar se o sangue colhido em papel alterava quando deixado à temperatura ambiente; para isso retiramos do congelador amostras que aí se mantinham há 60 dias, sem perda das propriedades antigênicas e deixamo-las durante uma semana à temperatura ambiente (mais ou menos 22°C). Os resultados obtidos, embora positivos deram lugar a reações de intensidade muito mais fraca do que a observada anteriormente. Esta nossa constatação não está de acordo com a referida por ou-

tros autores, Vaisman e cols, em 1963, que indicam que o sangue, mesmo mantido a temperatura ambiente conservava seus anticorpos pelo menos durante seis meses.

Contudo, os resultados que agora conseguimos concordam com os de Le Vignelloux e cols. (1969) os quais referem que a temperatura ambiente, em meio tropical, modifica as propriedades do sangue colhido em papel de filtro.

Também um de nós (F. R.) tinha verificado que o sangue guardado em subscrito de papel, a temperatura do laboratório dava sempre lugar a reações negativas, quando assim permanecia mais de uma semana.

Os nossos resultados, utilizando como antígeno, fragmentos de *S. mansoni* adulto, fresco, mostraram-se de sensibilidade e especificidade comparáveis aos das reações em que se usa fragmentos de vermes liofilizados.

Embora primitivamente, tivéssemos tentado empregar vermes nestas condições, não conseguimos uma aderência adequada às lâminas que nos permitisse efetuar as reações em condições de leitura satisfatória. Enquanto que o método por nós aconselhado dá lugar a uma aderência perfeita dos fragmentos dos vermes às lâminas e torna a técnica mais simples, rápida e econômica, uma vez que não necessitamos de aparelhagem especializada, além daquela necessária para toda a reação de imunofluorescência.

Devemos considerar também que para inquéritos epidemiológicos em regiões de endemicidade, a facilidade da colheita de sangue em papel de filtro, por simples picada do dedo, torna o método extensivo a áreas onde dificilmente encontramos técnicos especializados.

#### SUMMARY

#### VALUE OF AN ANTIGEN OF ADULTS. MANSONI FOR IMMUNOFLOURESCENCE REACTIONS ON SLIDES

Fragments of fresh adult *S. mansoni* were used as antigen for indirect immunofluorescent reactions on slides.

The procedure is easy and adherence of the antigen to the slides is perfect.

Blood was obtained from normal and experimentally infected animals. No false positive reaction and 98,6% positive results were obtained.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. I.; SADUN, E.H. & WILLIAMS, I.S. — Preserved cercariae in the fluorescent antibody (F.A.) test for schistosomiasis Exp. Parasit. 11:226-230, 1961b.
- BARBOSA, W., ROBERT, P.C. & ROCHA, R.P.M. — Notas sobre a imunologia das filariose — I Diagnóstico pela técnica de imunofluorescência indireta em lâmina, como um novo antígeno de *Onchocerca volvulus* obtidos dos nódulos — *Jornal da Soc. Médica de Lisboa*. 135:463 a 478, 1971.
- CAMARGO, M.E. — Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescence serological titrations. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7:39-40, 1965.
- CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S.; & SILVA, L.C. — A slide fluorescent antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnosis of schistosomiasis mansoni — *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 327-331, 1965.

- LE VIGUELLOUX, J.; BOCHE, R.; ROUX, J.; & ALAUSE, P. — Utilisation des Réactions d'immunofluorescence indirecte dans les études épidémiologiques. B — I.F. de la Bilharziose sur sang sec. Med. Trop. 26:685-688, 1969.
- LE VIGUELLOUX, J.; BOCHE, R. ROUX, J.; ALAUSE, P. — Reaction d'immunofluorescence sur Broyat de Schistosoma mansoni — Results complementaires — Medicine Tropicale 29: 680-684, 1969.
- LE VIGUELLOUX, J.; ALAUSE, P. JAN, Ch.; LABAN, P. & DOURY, J.C. — Pratique de la Reaction d'immunofluorescence indirecte sur Broyat de Schistosoma mansoni — I Technique et Valeur — Med. Trop. 31:393-398, 1971.
- LE VIGUELLOUX, J.; ALAUSE, P.; JAN, Ch.; LABAN, P. & DOURY, J.C. — Pratique de la reaction d'immunofluorescence indirecte sur Broyat de Schistosoma mansoni — II Resultats e interpretation — 31: 399-403, 1971.
- ROMBERT, P.C. — Uma nova técnica de imunofluorescência para sorodiagnóstico da bilharziose — An. Esc. Nac. Saúde Públ. e Med. Trop. 2:175-183, 1968.
- ROMBERT, P.C. — Preparação de antígenos e técnica de Imunofluorescência em Helminologia — em publicação.
- SADUN, E.H.; WILLIAMS, I.S. & ANDERSON, R.I. — Fluorescent antibody technique for the serodiagnosis of schistosomiasis in humans. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 105:289-291, 1960.
- VAISMAN, A. PARIS AMELIN A. & CUTHE, T. — Le teste d'immunofluorescence des Treponemes appliqué au sang sec — Na presse Medica. 54: 2653-2654, 1963.
- ANDERSON, R.I.; SADUN, E.H. & WILLIAMS, I.S. — Preserved cercariae in the fluorescent antibody (F.