

NOTAS SÔBRE A IMUNOLOGIA DAS FILARIOSES *

II — R. I. F. em lâmina com ovos de Filárias extraídos de vermes.

PALMIRA C. ROMBERT ** WILLIAM BARBOSA ***
RAUL P. MARTINS ROCHA ****

RESUMO

Os autores usam como antígeno em R. I. F. para diagnóstico de filariose, ovos de *D. immitis* e de *Loa loa* contidos no útero das fêmeas. As reações são efetuadas em lâmina, segundo o método indireto e com coloração de contraste pelo azul de Evans.

Descrevem assim percentagem de positividade variando de 85% a 100% sem falsas reações positivas desde que só atribuam valor aos resultados obtidos com diluições dos sôros acima de 1/40, tendo estudado casos de Oncocercíase, Loíase e Bancroftíase.

INTRODUÇÃO

O emprêgo de ovos de parasitas para a R. I. F. não é própria-mente uma novidade pois já Zaman e Singh (1965), Taffs e Voller, (1963) e Rivera de Sala e outros (1962), os tinham utilizado.

Inclusivamente um de nós (P.R.) em 1967, tinha obtido resultados apreciáveis com o emprêgo de ovos de *Necator americanus* e *Ancylostoma caninum* na identificação de sôros de doentes de ancilose-

* Trabalho realizado na Escola Nacional de Saúde Pública e de Medicina Tropical de Lisboa (Cadeira de Entomologia e Helmintologia e Cadeira de Patologia e Clínica Tropical).

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

*** Prof. Titular de Doenças Infecciosas e Parasitárias; Prof. Adjunto de Parasitologia (Protozoologia) do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás; Bolsista da Junta de Investigações do Ultramar e da CAPES.

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

tomíase, além de ter já usado ovos de *Schistosoma* para o despiste de precipitinas circum-ovais pela técnica de imunofluorescência (1965).

No entanto, quase todos estes métodos são demasiadamente trabalhosos pela dificuldade de obter ovos limpos e em boas condições para serem utilizados na R. I. F., pois a maior parte tem de ser colhido das fezes e vêm contaminados com muitas impurezas. Taffs e Voller na sua experiência em *Ascaris* colheram realmente os ovos do útero da fêmea grávida, mas segundo Zaman e Singh a este processo caberia a responsabilidade das reações inespecíficas que tiveram com ovos não descortificados.

Como tivemos ocasião de obter vermes vivos (filárias adultas de *Dirofilaria immitis* e de *Loa loa*) ocorreu-nos utilizar os ovos contidos no útero das fêmeas em diversos graus de embrionamento e completamente limpos de impurezas e em grande número, para a realização da reação.

Por outro lado tínhamos já encontrado dificuldades com a realização da reação com microfíliarias pois embora estas sejam de relativamente fácil obtenção, a partir do sangue ainda que não em grande número, não aderem facilmente às lâminas e quando empregadas na técnica em tubo, têm um grande desgaste pois se perdem muitas nas lavagens.

Da técnica que empregamos e dos resultados obtidos, vimos dar conta no presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Fizemos duas séries de experiências, numa das quais utilizamos ovos de *D. immitis* colhida do coração de um cão infetado que mantínhamos como fonte de microfíliarias, e morreu espontaneamente.

Na outra experiência usamos ovos de *Loa loa* que foi obtida por dissecação do tecido celular subcutâneo de um paciente infetado.

Qualquer destas filárias foi mantida no congelador a -30°C a primeira por 3 dias e a segunda por 5 meses.

Após descongelação e dissecação das filárias, os ovos foram recolhidos em soluto salino tamponado, de fosfato de pH- 7,2, depois de lavados com o mesmo soluto e divididos por diversos tubos em pequenas porções, sendo de novo guardados no congelador até ao momento do uso.

Para a preparação das lâminas que utilizamos segundo a mesma técnica descrita para o uso do antígeno de *Onchocerca volvulus* (W. B. et al, 1970), bem limpas e desengorduradas e divididas por meio de Araldite em 10 campos iguais, depois de procedermos ao descongelamento dos ovos, ressuspendemo-los no soluto tampão e colocamos uma

pequena gota da suspensão em cada campo das lâminas tendo o cuidado de não utilizar ovos em excesso.

Tivemos ocasião de verificar que a suspensão aderiu com facilidade às lâminas dando a impressão de o soluto estar ligeiramente albuminoso e observando ovos em diversos graus de desenvolvimento e microfíliarias.

Na 1.^a experiência com ovos de *D. immitis* empregamos 20 sôros de filariósicos, sendo respectivamente 7 de Oncocercíase, 8 de Loíase e 5 de Bancrofitíase, de indivíduos naturais da Guiné Portuguesa. Utilizamos ainda 16 eluatos de sangue de indivíduos brasileiros portadores de ancilostomíase e/ou estrogiloidíase, naturais da região centro-oeste do Brasil, isenta de filaríases. E ainda 11 sôros normais.

A 2.^a experiência realizada com ovos de *Loa loa* foi efetuada com um número mais reduzido de sôros: apenas 9 de filaríases, 3 de cada uma das espécies que obtivemos, 10 sôros normais e 4 eluatos de sangues de brasileiros que tinham dado um resultado duvidoso com o antígeno de ovos de *D. immitis*.

Técnica — Utilizamos a técnica habitual da reação indireta de I. F. havendo, no entanto, a notar que os ovos não foram fixados nem deslipidizados por formol ou acetona.

Após seco, o produto colocado nas lâminas foi submetido 1/2 hora à ação dos sôros em câmara úmida a 37° , lavado duas vezes em soluto tampão de fosfatos 0,01 M (P.B.S.), submetido novamente 1/2 hora à ação da anti-globulina marcada com isotiocianato de fluoresceína nas mesmas condições e lavado. Como contra-coloração, usamos o azul de Evans a 1/10.000 durante 15 minutos seguido de novas lavagens.

Cada campo das lâminas foi montado com glicerol e coberto com pequena lamela redonda para ser observado em microscópio Zeiss de luz ultra-violeta obtida por lâmpada Osram de vapor de mercúrio HBO 200. Como habitualmente usamos os filtros de excitação I e II e os de paragem 50 e 47.

Usamos os sôros em diversas diluições a partir de 1/20 e até 1/320 e a globulina marcada foi empregada na diluição de 1/40.

Consideramos positivas as reações em que os ovos tomavam uma cor vermelha, rodeados por uma nítida fluorescência verde-amarela periférica e negativas aquela em que os ovos se apresentavam apenas vermelhos.

No entanto, algumas vezes encontramos fluorescência esverdeada no interior dos ovos o que consideramos como fluorescência inespecífica e sinal de alteração do material.

Em alguns campos apareciam microfírias rodeadas de um halo fluorescente nas reações positivas ou apenas vermelha nas negativas.

RESULTADOS

Vamos considerar separadamente os resultados de cada uma das experiências.

Com os ovos de *D. immitis* obtivemos nas duas primeiras diluições cerca de 18 casos positivos nos 20 sôros de filariósicos. Como, porém, com os sôros testemunhas também obtivemos algumas reações positivas a 1/20 e duvidosas a 1/40 apenas começamos a atribuir valor de positividade acima desta diluição. Mas, como por outro lado nenhum dos sôros testemunhas deu reação duvidosa em diluições superiores a 1/40 parece-nos que podemos considerar como positivas ou melhor, fracamente positivas as reações que a partir de 1/40 nos dêem um resultado duvidoso.

Segundo este novo critério podemos verificar que se encontraram nos 20 sôros de pacientes com filariose 17 reações positivas a 1/80, 16 positivas a 1/160 e 12 positivas a 1/320.

Verificamos também que dentre as diversas espécies de filaríases que estudamos foi a Loíase a mais responsável pelos resultados negativos, visto que 2 dos sôros foram sempre negativos, 1 foi negativo a partir de 1/80, outro a partir de 1/160 e, na diluição de 1/320, só um sôro foi fracamente positivo ou duvidoso, sendo os resultados negativos.

Portanto, considerando os resultados em conjunto e considerando válidas as reações a partir da diluição de 1/40 obtivemos com este novo antígeno 85% de reações positivas em casos confirmados da doença sem falsas reações positivas com sôros normais ou de portadores de ancilostomas ou strongiloides. Tabela I.

Quanto às reações efetuadas com ovos de *Loa loa*, verificamos que foram positivas em tôdas as diluições com sôros de Loíase e na diluição de 1/320 apenas foram positivos em 2 de cada 3 sôros de oncocercíase e bancroftíase.

No total foram 100% positivos a 1/80 e 1/160 e 77,7% positivos a 1/320.

Em 10 sôros normais tôdas as reações foram negativas 1/80, o mesmo se observando com os 4 eluatos que tinham dado um resultado duvidoso com o antígeno constituído pelos ovos de *D. immitis* na diluição do 1/40. Tabela II.

TABELA I

Resultados das R.I.F. com ovos de *D. immitis*

Soros	Diluições					Observações
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
Normais 11	P - 3 D - 5 N - 3	D - 3 N - 8	N - 3			Só foram repetidos na diluição a 1/80 os duvidosos a 1/40
Filariósicos 20	P - 18 N - 2	P - 17 D - 1 N - 2	P - 16 D - 1 N - 3	P - 7 D - 9 N - 4	P - 2 D - 10 N - 8	
Eluatos de sangues de doentes de strongiloidíase e/ou ancilostomíase - 16	P - 2 D - 11 D - 11 N - 3	D - 7 N - 9	N - 3			Só foram repetidos 3 dos eluatos duvidosos a 1/40. Os restantes examinados c/ovos de <i>Loa loa</i>

TABELA II

Resultados das R.I.F. com ovos de Loa loa

Diluições	1/40		1/80		1/160		1/320		Observações
	P.	N.	P.	N.	P.	N.	P.	N.	
Soros									
Normais 10				10					
Filarioses 9	3L. 30v. 3Fb.		3L. 30v. 3Fb.		3L. 30v. 3Fb.		3L. 20v. 2Fb.	10v. 1Fb.	
Eluatos de sangues de Ancilostomíase e Strongiloidíase 4				4					Só foram examinados eluatos que = deram resultado du vidoso a 1/40 c/ ovos de <u>D.immitis</u>

COMENTÁRIOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos permitem considerar os ovos de *Filária* contidos no útero do verme fêmea como um bom antígeno para a R.I.F. nas filarioses.

Por um lado é prática a sua obtenção em boas condições para a prova e por outro a facilidade de leitura da reação é muito grande, pois tanto os ovos como as microfírias se mostraram intensamente fluorescentes na periferia e vermelhos no interior. No entanto na mesma preparação observaram-se, por vezes, ao lado de ovos em boas condições, outros alterados que mostravam fluorescência interna inespecífica. Só a presença ou ausência de fluorescência periférica nos permite dar o resultado da reação.

A percentagem de positividade tanto com uns como com outros ovos foi bastante elevada e a especificidade absoluta, desde que apenas consideramos como válidos os resultados nas diluições acima de 1/40.

SUMMARY

NOTES ON IMMUNOLOGY OF FILARIASIS

Immunofluorescent slide test with Eggs obtained from worms

Eggs of *D. immitis* and of *Loa loa* taken from the uterus of females were used as an antigen in the immunofluorescent test for the diagnosis of filariasis. The reactions were performed on slides and Evans blue was used as counterstain.

The percentage of positive reactions ranged between 85% and 100%. No false positive reactions were obtained with dilutions over 1/40.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, W. & ROMBERT, P.C. — Notas sobre a imunologia das filarioses — I Diagnóstico pela técnica de imunofluorescência indireta, em lâmina, com um nvo antígeno *Onchocerca volvulus* obtido dos nódulos — Rev. Pat. Trop. 1: 93-106, 1972.
2. FRAGA de AZEVEDO, J. & ROMBERT, P.C. — The diagnosis of helminthiasis by immunofluorescence. Anais do Inst. Med. Trop. 22:49-55, 1965.
3. RIVERA de SALA, A; MENÉDEZ CORRADA, R. & RODRIGUES MOLINA, R. — Detestion of circum-oval precipitins by the fluorescent antibody technique — P.S.E.B. Med. 111:212-215, 1962.

4. TAFFS, L.F. & WOLLER, A. — In vitro fluorescent antibody studies on *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* — T.R. Soc. Trop. Med. Hyg. 57:353-358, 1963.
5. VIEIRA, R.A. & ROMBERT, P.C. — Estudos sôbre ancilostomídeos — 1.º Morfologia das larvas filariformes. — 2.º — Taxa de desenvolvimento larvar. — 3.º — Imunofluorescência aplicada ao diagnóstico da ancilostomíase. Anais E.N.S.P. Med. Trop. 2:129-161, 1968.
6. ZAMAN, V. & SINGH. — Immuno-fluorescent studies with hookworms I — Antigenic relationships of ova. T.R. Soc. Trop. Med. Hyg. 59:690-693, 1965.