

AVALIAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE* PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCYSTICERCOSE UTILIZANDO CONJUGADOS ANTICORPO-LECTINA

CLAUDIO LÚCIO ROSSI *

RESUMO — Um extrato bruto de *Cysticercus cellulosae* foi fracionado por cromatografia em coluna de Sephadex G-200, com o objetivo de se encontrar alguma fração com alta atividade antigênica para ser utilizada no imunodiagnóstico da neurocisticercose. O perfil de eluição proteico da cromatografia revelou dois picos distintos (frações I e III) e, entre os dois uma fração bastante heterogênea composta de vários picos (fração II). Uma técnica baseada na utilização de conjugados contendo lectina com afinidade para eritrócitos (Erythro — LIT) foi utilizada para a avaliação das frações. Os títulos de Erythro-LIT obtidos com o extrato bruto de cisticercos e com as frações mostraram que a maior parte dos anticorpos anti *Cysticercus cellulosae*, presentes em amostras de líquido cefalorraqueano de pacientes com neurocisticercose, reconheceram componentes antigênicos da fração II.

Evaluation of antigenic fractions from *Cysticercus cellulosae* for immunodiagnosis of neurocysticercosis using antibody-lectin conjugates.

SUMMARY — In an attempt to find out some fraction with high antigenic activity for the immunodiagnosis of neurocysticercosis a crude extract from *Cysticercus cellulosae* was fractionated by Sephadex G-200 column chromatography. The protein elution profile revealed two distinct peaks (fractions I and III) and a heterogeneous fraction containing several peaks (fraction II). The crude extract and the fractions were tested by Erythro-Lectin Immuno Test (Erythro-LIT) using cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. The results of Erythro-LIT antibody titers showed that most of the anticysticercus antibodies recognized antigenic components contained in the fraction II.

Neurocisticercose (NC) é problema de saúde pública importante em muitos países da Ásia, África e América Latina^{2,12,22}. A sintomatologia da NC pode ser muito variada, sugerindo diagnósticos neurológicos e psiquiátricos diversos^{15,21}. Deste modo, a detecção de anticorpos específicos representa papel importante no diagnóstico final da doença. Praticamente todas as reações imunológicas convencionais têm sido utilizadas na pesquisa de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae*⁶. Neste particular, destacam-se as reações de fixação de complemento^{16,18}, hemaglutinação indireta¹⁷, imunofluorescência indireta^{10,20} e as imunoenzimáticas^{1,3-5}. Guesdon e Avrameas^{8,9}, com base nas propriedades das lectinas, prepararam conjugados anticorpo-lectina e desenvolveram técnicas de alta sensibilidade para a titulação e quantificação de antígenos e anticorpos. Os procedimentos baseados na utilização de conjugados anticorpo-lectina são conhecidos como 'Lectin Immuno Tests' (LIT). Nestes procedimentos as lectinas funcionam como aceptores de marcadores glicosídicos. O uso de eritrócitos como marcadores, na técnica Erythro-LIT, tornou o procedimento muito simples e barato. Utilizando Erythro-LIT e um extrato bruto de *Cysticercus cellulosae*, Rossi et al.¹⁹ detectaram anticorpos específicos em 92% de amostras de líquido cefalorraqueano

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas: * Professor Assistente Doutor.

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP — Caixa Postal 6111 — 13081 Campinas SP — Brasil.

(LCR) de pacientes com NC. O uso de extratos brutos de parasitas como fonte de antígenos pode explicar a falta de sensibilidade e/ou especificidade dos métodos imunodiagnósticos. Nos extratos brutos antígenos relevantes podem estar em concentrações inadequadas, bem como materiais estranhos ao parasita podem estar presentes.

No presente estudo, numa tentativa de encontrar alguma fração com alta atividade antigênica, um extrato bruto de *Cysticercus cellulosae* foi fracionado por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 e as frações obtidas foram avaliadas pela técnica Erythro-LIT.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Extrato bruto de cisticercos — O extrato bruto de cisticercos foi preparado de acordo com Rossi et al. (19), com algumas modificações. Resumidamente, após a retirada do líquido vesicular, 45 parasitas foram ressuspensos em 90 ml de acetona gelada, e o material foi mantido a 4°C durante 10 minutos. Após tratamento com acetona o sobrenadante foi decantado e os parasitas foram secos sob fluxo de nitrogênio. Os parasitas secos foram ressuspensos em 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M/NaCl 0,15 M, pH = 7,3 (PBS) e a mistura foi homogeneizada a 4°C em homogenizador elétrico Potter-Elvehjen. O material foi mantido sob agitação lenta a 4°C durante 15 horas e a seguir foi centrifugado a 50000g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado cuidadosamente, alíquotado e armazenado a -80°C.

2. Cromatografia em coluna de Sephadex G-200 — Utilizou-se coluna de 2,1×101 cm de Sephadex G-200 (Sigma Chemical Co., USA) equilibrada com PBS. O extrato bruto foi dialisado contra PBS e uma alíquota de 3 ml contendo 8,4 mg de proteínas foi aplicada à coluna. A eluição foi processada a 4°C com o tampão de equilíbrio a uma velocidade de fluxo de 9 ml/hora. O efluente foi recolhido em frações de 1,7 ml/tubo e sua absorbância foi determinada a 280 nm (espectrofotômetro Bausch & Lomb). As frações foram concentradas utilizando ultrafiltros que retêm moléculas de peso molecular maior do que 10000 (CX-10, Millipore, USA).

3. LCR — Foram obtidas 8 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico de NC, todas reagentes por Erythro-LIT e ELISA. Para a técnica Erythro-LIT as amostras de LCR foram absorvidas com eritrócitos de carneiro.

4. IgG humana — A IgG humana foi isolada de soros humanos normais, por cromatografia de troca iônica, de acordo com o método de Vaerman et al. (22).

5. Anti-IgG humana — A anti-IgG humana foi isolada de soro de burro anti-soro humano total por cromatografia de afinidade, usando IgG humana acoplada a Sepharose 4B como adsorvente. A cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com o método de Garvey et al. (7).

6. Aglutinina de germe de trigo (AGT) — A AGT foi isolada de acordo com a metodologia descrita por Nagata e Burger (13) e Nagata et al. (14).

7. Conjugado anti-IgG humana — AGT — O conjugado foi preparado e titulado de acordo com Guesdon e Avrameas (8,9).

8. Erythro-LIT — Placas de poliestireno, fundo em U, (Interlab, São Paulo, Brasil), foram utilizadas como suporte para a adsorção do extrato bruto de cisticercos e suas frações obtidas por cromatografia. As placas foram sensibilizadas durante 1 hora a 37°C e 16 horas a 4°C com 0,1 ml de tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH=9,5, contendo 4 µg de proteína/ml. Após a sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 (Sigma Chemical Co., USA) a uma concentração de 0,05% (PBS/T). Após as lavagens, 0,1 ml de diluições seriadas de LCR (1:1 a 1:8192) em PBS/T contendo 0,3% de gelatina (PBS/TG), foram adicionados aos orifícios das placas. Após incubação por 1 hora a 37°C e três lavagens com PBS/T, adicionou-se 0,1 ml do conjugado diluído a 1:800 em PBS/TG, contendo 0,1M de N-acetil-D-glicosamina (Sigma Chemical Co., USA). Após incubação por 1 hora a 37°C e três lavagens com PBS/T, adicionou-se aos orifícios 0,1 ml de uma suspensão de eritrócitos de carneiro a 0,07% em PBS. Após incubação por 3 horas a temperatura ambiente, o título de anticorpos foi lido como a maior diluição do LCR mostrando uma eritroadsorção nítida.

9. Dosagem de proteínas — As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Lowry et al. (11).

RESULTADOS

Na figura 1 é mostrado o resultado da cromatografia em coluna de Sephadex G-200 do extrato bruto de cisticercos. O perfil de eluição proteico revelou dois picos distintos (frações I e III) e, entre os dois, uma fração bastante heterogênea composta de vários picos (fração II).

Os títulos de Erythro-LIT para o extrato bruto de cisticercos e para as frações I, II e III em 8 amostras de LCR de pacientes com NC estão expressos na tabela 1. Das amostras de LCR testadas, três foram reagentes somente com a fração II (amostras 1, 2 e 3), três foram reagentes com as frações II e III (amostras 5, 6 e 8) e duas foram reagentes com as frações I, II e III (amostras 4 e 7). Com relação as frações, os maiores títulos de anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae* foram obtidos com a fração II.

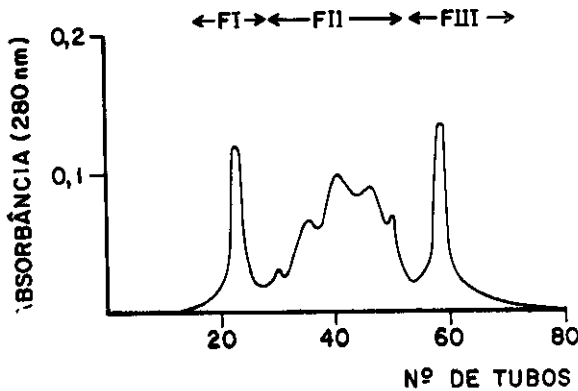


Fig. 1 — Cromatografia em Sephadex G-200 do extrato bruto de cisticercos. Uma alíquota de 3 ml do extrato bruto de cisticercos, contendo 8,4 mg de proteínas, foi aplicada à coluna (2,1 × 161 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M/NaCl 0,15 M, pH = 7,3. A eluição foi processada a uma velocidade de fluxo de 9 ml/hora (1,7 ml/tubo).

Amostras de LCR	Títulos de Erythro-LIT			
	Extrato bruto	F I	F II	F III
1	32	NR	32	NR
2	64	NR	64	NR
3	128	NR	64	NR
4	256	1	128	2
5	256	NR	128	2
6	512	NR	512	4
7	1024	1	1024	1
8	4096	NR	4096	2

Tabela 1 — Títulos de Erythro-LIT em amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose. As frações I, II e III foram obtidas pelo fracionamento do extrato bruto de cisticercos em coluna de Sephadex G-200. NR, não reage.

COMENTÁRIOS

Grande variedade de técnicas tem sido utilizada para o imunodiagnóstico da NC e cada uma delas tem a sua combinação própria de sensibilidade e especificidade⁶. A seleção de uma técnica imunológica, para finalidade de pesquisa ou diagnóstico, depende de uma série de variáveis: sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, custo e facilidade de execução. Guesdon e Avrameas^{8,9} utilizando conjugados anticorpo-lectina desenvolveram técnicas de alta sensibilidade para a titulação e quantificação de antígenos e anticorpos. Em particular, a utilização de conjugados contendo lectina com afinidade para eritrócitos, na técnica Erythro-LIT, tornou o procedimento simples e barato. Utilizando a técnica Erythro-LIT e um extrato bruto de *Cysticercus cellulosae*, como fonte de antígenos, temos sido capazes de detectar anticorpos específicos em 92% dos LCR de pacientes com NC¹⁹.

No presente estudo, um extrato bruto de cisticercos foi fracionado, por cromatografia em coluna de Sephadex G-200, com o objetivo de se encontrar alguma fração

com alta atividade antigênica. O perfil de eluição proteico revelou dois picos distintos (frações I e III) e, entre os dois, uma fração bastante heterogênea composta de vários picos (fração II). Os títulos de Erythro-LIT, obtidos com o extrato bruto de cisticercos e com as frações I, II e III, mostraram que a maior parte dos anticorpos anti-*Cysticercus cellulosae*, presentes em LCR de pacientes com NC, reconheceram componentes antigênicos da fração II.

REFERÊNCIAS

1. Arambulo PV III, Walls KW, Bullock S, Kagan IG — Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). *Acta Tropica* 35:63, 1978.
2. Canelas HM — Neurocisticercose: incidência, diagnóstico e formas clínicas. *Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo)* 20:1, 1962.
3. Costa JM, Ferreira AW, Makino MM, Camargo ME — Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 24:327, 1982.
4. Diwan AR, Coker-Vann M, Brown P, Subinato DB, Yolken R, Desowitz R, Escobar A, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC — Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am J Trop Med Myg* 31:364, 1982.
5. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A — Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 24:536, 1986.
6. Flisser A, Pérez-Montfort R, Larraide C — The immunology of human and animal cysticercosis: a review. *Bull WHO* 57:839, 1979.
7. Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH — Dissociation from insoluble antigen adsorbent (affinity chromatography). In Benjamin WA (ed): *Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction and Research*. WA Benjamin, Massachusetts, 1977, pg 245.
8. Guesdon JL, Avrameas S — Lectin immuno tests: quantitation and titration of antigens and antibodies using lectin-antibody conjugates. *J Immunol Methods* 39:1, 1980.
9. Guesdon JL, Avrameas S — Use of lectin-antibody conjugates for quantitation and titration of antigens and antibodies. *Methods Enzymol* 92:489, 1983.
10. Livramento JA — Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. *Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo)* 39:261, 1981.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265, 1956.
12. Mahajan RC — Geographical distribution of human cysticercosis. In Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Ridaura C, Beltran F (eds): *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, New York, 1982, pg 39.
13. Nagata Y, Burger MM — Wheat germ agglutinin: isolation and crystallization. *J Biol Chem* 247:2248, 1972.
14. Nagata Y, Goldberg AR, Burger MM — The isolation and purification of wheat germ and other agglutinins. *Methods Enzymol* 32:611, 1974.
15. Nash TE, Neva FA — Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N Engl J Med* 311:1492, 1984.
16. Nieto D — Cysticercosis of the nervous system: diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology* 6:725, 1956.
17. Proctor EM, Powell SJ, Elsdon-Dew R — The serological diagnosis of cysticercosis. *Ann Trop Med Parasitol* 60:146, 1966.
18. Reis JB, Bei A, Reis JB Filho — Nossa experiência com a reação de fixação de complemento pela técnica de Wadsworth, Maltaner e Maltaner adaptada ao líquido cefalorraqueano para o diagnóstico da sífilis e da cisticercose. *Rev Paul Med* 62:118, 1963.
19. Rossi CL, Prigenzi LS, Livramento JA — Erythro-Lectin Immuno Test (ERYTHRO-LIT) in the immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Braz J Med Biol Res*, no prelo.
20. Rydzewski AK, Chisholm ES, Kagan IG — Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemmagglutination, indirect immunofluorescent antibody, and agar gel precipitin tests. *J Parasitol* 61:154, 1975.
21. Shanley JD, Jordan MC — Clinical aspects of CNS cysticercosis. *Arch Intern Med* 140:1309, 1980.
22. Takayanagui OM, Jardim E — Aspectos clínicos da neurocisticercose: análise de 500 casos. *Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo)* 41:50, 1983.
23. Vaerman JP, Heremans JF, Vaerman C — Studies of the immunoglobulins of the human serum: I. A method for the simultaneous isolation of the three immunoglobulins (gamma-SS, gamma-1M and gamma 1-A) from individual small serum samples. *J Immunol* 91:7, 1963.