

ANTÍGENO HETERÓLOGO NO DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA WUCHERERIOSE: EXTRATO DE *SETARIA EQUINA* UTILIZADO NA REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA – ELISA

MÁRIO CAMARGO
DALAIR SOUZA
NORMA CARNEIRO
MARISA MAKINO
JOSÉ ROBERTO MINEO
DIVA MONTENEGRO

A reação imunoenzimática – ELISA foi empregada na sorologia da Wuchereriose, utilizando como antígeno extrato bruto de verme adulto de Setaria equina. Foram estudados soros de 139 indivíduos em três grupos:

grupo 1 – de pacientes com diagnóstico parasitológico de Wuchereriose;

grupo 2 – de pacientes com diversas patologias;

grupo 3 – de pessoas clinicamente normais, de área endêmica e não endêmica.

O antígeno utilizado mostrou alta comunidade antigênica com a W. bancrofti. As reações cruzadas, obtidas em particular com soros de pacientes com parasitoses intestinais (âscaris, ancilóstoma) recomendam a investigação de frações antigênicas de Setaria equina que possam fornecer testes de maior especificidade.

O emprego de antígenos solúveis na reação imunoenzimática, por Engvall & Perlman (1971), abriu a possibilidade de aplicação da técnica ao diagnóstico de várias doenças infecciosas. Em parasitologia, esta se iniciou por Ljungström, Engvall & Ruitenberg (1974) e Ruitenberg (1974) na sorologia da Trichinellose.

Na Wuchereriose, o método foi utilizado por alguns pesquisadores, com antígenos de diferentes espécies de filárias. Para Dissanayke & Ismail (1980a), tais antígenos solúveis foram obtidos de verme adulto de *Setaria digitata*, e uma técnica foi descrita para eliminar reações inespecíficas, Dissanayke & Ismail (1980b).

Kaliraj, Ghirnikar & Harinath (1981), deram preferência a extratos de microfilárias de *W. bancrofti*.

A dificuldade de obtenção de grandes quantidades de microfilárias de *W. bancrofti* levou-nos a investigar a utilização de antígenos solúveis de *Setaria equina* na reação imunoenzimática – ELISA – para o diagnóstico sorológico da Wuchereriose.

Trabalho realizado nos laboratórios de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Caixa Postal 6034 – 50000 Recife, PE, Brasil.

Recebido para publicação em 17 de fevereiro e aceito em 5 de maio de 1982.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos – Vermes adultos de *Setaria equina*, retirados da *cavidade abdominal* de cavalos sacrificados em matadouro, foram lavados 3 vezes em solução de NaCl a 0,85% e liofilizados. A cerca de 20 mg destes, adicionou-se benzeno e triturou-se em homogeneizador de tecidos, por 5 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 2.000 g por 15 minutos e o sedimento seco em estufa a 37°C. O sedimento, ressuspenso em 2 ml de água destilada, foi submetido a ultra-som (40 KHz) por 20 segundos, 3 vezes, e a mistura isotonicada pela adição de 2 ml de solução de NaCl a 1,78%. Repetiu-se o tratamento por ultra-som e centrifugou-se a mistura a 2.000 g, por 10 minutos. A concentração protéica do sobrenadante, determinada pelo método de Lowry, Rosenbrough, Farr & Randall (1951), foi de 1.600 mg/ml. Este antígeno solúvel, titulado no teste imunoenzimático diante de soros de pacientes infectados e não infectados pela *W. bancrofti*, mostrou como ótima a concentração de 10 µg de proteínas por mililitro.

Soros – Estudaram-se 139 soros, de pacientes com diagnóstico parasitológico de Wuchereriose, de pacientes com patologias diversas e de pessoas clinicamente normais, vivendo em área endêmica e em área não endêmica para a filariose.

Conjugado enzimático – Foi preparado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, marcando-se com peroxidase (Horseradish peroxidase, type VII, Sigma Chemical Co.), pela técnica de Nakane & Kawaoi (1974), modificada, a fração globulínica de soro de carneiro imunizado com IgG humana. Para torná-lo específico para cadeias “gamma” de IgG, este soro foi adequadamente absorvido.

Teste Imunoenzimático – Sensibilizaram-se placas de polietireno (Plásticos Ampla Ltda., São Paulo, Brasil) com cavidades em U, incubando-se em cada alvéolo 0,2 ml de diluição de extrato antigênico em tampão carbonato 0,06M, pH, 9,6 a 4°C por 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada (CINa 0,15M, fosfatos 0,01M, pH 9,6) com Tween 20 a 0,05% (PBS-Tween).

Os testes foram realizados com soros em diluições dobradas, a partir de 1:16, em PBS-Tween contendo BSA a 1%, incubando-se volumes de 200 µl por 60 minutos a 37°C.

As placas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada, com PBS-Tween, e incubadas com 200 µl por alvéolo, da diluição adequado do conjugado, em PBS-Tween-BSA 1%.

Após novas lavagens, adicionou-se o substrato constituído de peróxido de hidrogênio 1,47 mM e ácido 5-aminosalicílico 5,23 mM (para seu preparo, dissolveram-se 8 mg do ácido 5-aminosalicílico em 10 ml de água destilada a 70°C, e ajustou-se para pH 6,0 com NaOH 0,1 M. A nove partes desta solução adicionou-se uma parte de solução de peróxido de hidrogênio a 0,05%), mantendo-se as placas à temperatura ambiente por 60 minutos, ao fim dos quais a reação foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de NaOH 1M. As leituras das reações foram feitas em 450 nm em cubetas de 1 mm de espectrofotômetro Beckman DU-2.

RESULTADOS

Os 139 soros estudados foram divididos em 3 grupos, o primeiro incluindo 57 soros de pacientes com microfilárias no sangue periférico. O segundo grupo abrangeu soros de pacientes com diversas patologias, sendo 5 de portadores de doença de Chagas, 15 de esquistossomose, 2 de toxoplasmose, 4 de malária, 4 de calazar, 2 de sífilis, 5 de cisticercose, 2 de histoplasmose e 15 de parasitoses intestinais (ascaridiase, ancilostomiase e trichuriasis). O grupo 3 incluiu soros de pessoas clinicamente normais, sendo 25 residentes em área endêmica de filariose e 3 em área não endêmica.

Na Tabela I encontram-se os resultados dos grupos 1 e 3 e na Tabela II, do grupo 2.

TABELA I

Grupos 1 e 3 - Reação imunoenzimática para a Wuchereriose. Média das unidades obtidas (D.O. x 100) e desvio padrão.

Grupos	Diluições dos Soros							
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Casos de Filariose	45,0 (±17,5)	33,9 (±16,2)	26,5 (±15,7)	18,2 (±13,1)	12,7 (±5,2)	6,2 (±4,6)	2,3 (±3,6)	1,9 (±2,1)
Pessoas normais de área endêmica	18,6 (±14,8)	13,4 (±12,7)	9,5 (±11,7)	5,0 (±7,5)	-	-	-	-
Pessoas normais de área não endêmica	6,3 (±1,8)	4,8 (±1,7)	3,3 (±1,5)	2,5 (±1,2)	2,1 (±1,0)	2,1 (±1,0)	1,2 (±0,5)	0,7 (±0,2)

TABELA II

Grupo 2 - Reação imunoenzimática para a Wuchereriose. Média das unidades obtidas (D.O. x 100) e desvio padrão.

Soros	Diluições dos Soros							
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Doença de Chagas	8,8 (±3,8)	7,1 (±3,4)	4,8 (±1,7)	3,6 (±0,8)	3,0 (±0,5)	2,7 (±0,3)	2,6 (±0,3)	2,2 (±0,3)
Esquistossomose	15,2 (±11,2)	11,8 (±11,1)	8,3 (±9,7)	5,8 (±6,4)	3,9 (±6,1)	2,7 (±4,4)	2,2 (±3,9)	1,6 (±0,6)
Malária	27,0 (±13,5)	25,2 (±12,1)	20,5 (±10,8)	16,5 (±8,9)	11,7 (±5,9)	7,7 (±4,1)	7,7 (±3,5)	3,7 (±0,8)
Calazar	10,4 (±5,1)	8,1 (±4,5)	5,2 (±3,0)	4,1 (±2,6)	3,3 (±2,5)	2,3 (±2,0)	2,3 (±1,9)	1,7 (±3,1)
Sífilis	12,5 (±0,5)	8,7 (±0,3)	7,0 (±0,3)	5,2	4,0	3,5	3,2	3,0
Cisticercose	14,1 (±14,3)	9,5 (±6,6)	6,0 (±6,3)	4,2 (±5,7)	3,0 (±2,3)	2,2 (±0,5)	2,0	1,5
Histoplasmose	4,2 (±0,3)	2,2 (±0,3)	-	-	-	-	-	-
Toxoplasmose	7,2 (±1,8)	6,2 (±1,7)	4,2 (±1,3)	3,2 (±0,8)	2,7 (±0,8)	2,5 (±0,5)	2,2 (±0,3)	1,7 (±0,3)
Parasitoses Intestinais	37,2 (±15,7)	28,4 (±15,3)	21,9 (±13,4)	13,4 (±9,6)	-	-	-	-

DISCUSSÃO

No presente trabalho utilizou-se extrato bruto de vermes adultos de *Setaria equina*, para o diagnóstico sorológico da Wuchereriose, devido à relativa facilidade de obtenção do parasita.

Na reação ELISA, os soros dos pacientes com microfilária no sangue periférico forneceram altas densidades ópticas, indicando grande comunidade antigênica com a *W. bancrofti*. Por outro lado, foram verificadas reatividades com outras patologias, em particular com as parasitoses intestinais estudadas. Os resultados obtidos encorajam o isolamento das frações antigênicas de maior especificidade, a partir dos extratos totais de *Setaria equina*, na expectativa de se conseguir um teste mais satisfatório para fins de diagnóstico.

SUMMARY

A total extract of *Setaria equina* adult worms was used as antigen in the enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA – for serological diagnosis of Wuchereriosis. Patients were included with a parasitological diagnosis of Wuchereriosis, with other diseases, as well as clinically normal individuals, in a total of 139 cases. The high titers observed for Wuchereriosis patients indicated a close antigenic community between *S. equina* and *W. bancrofti*. However, the frequent reactivity found in other parasitic diseases, especially intestinal parasitoses, suggests antigenic fractions should be investigated which could furnish higher specificity in the test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ENGVALL, E. & PERLMANN, P., 1971. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin. *G.Immunochemistry*, 8 :871-4.
- DISSANAYKE, S. & ISMAIL, M.M., 1980a. Antigens of *Setaria digitata*: cross-reaction with surface antigens of *Wuchereria bancrofti* microfilarias and serum antibodies of *W. bancrofti* – infected subjects. *Bull. World Health Organ*, 58 (4):649-654.
- DISSANAYKE, S. & ISMAIL, M.M., 1980b. ELISA in the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in man: a technique for reducing cross-reactivity. *Bull. World Health Org.* 58 (4) :655-657.
- KALIRAJ, P.; GHIRNIKAR, S.N. & HARINATH, B.C., 1981. Enzyme linked immunosorbent assay, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75. n° 1.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LJUNGSTRÖN, I.; ENGVALL, E. & RUITENBERG, E.J., 1974. ELISA, a new technique for the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection. In: Proceeding of the British Society for Parasitology, Parasitology, 69 XXIV.
- NAKAME, P.K. & KAWADI, A., 1974. Peroxidase – labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 22 :1084-1091.
- RUITENBERG, E.J., 1974. Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assay. *Bull. World. Health Organ*, 51 : 108.