

PESQUISA SIMULTÂNEA DE ANTÍGENO, ANTICORPO E IMUNOCOMPLEXOS ESPECÍFICOS NO SORO DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA

D.G. SURERUS CAMPOS*, M. QUEIROZ DA CRUZ*, R.M. SANTOS RODRIGUES*,
M. TENDLER**, N. KATZ*** & A. OLIVEIRA LIMA****

São descritas as principais etapas de uma técnica simples e sensível para a pesquisa, na mesma placa, do antígeno, do anticorpo e de imunocomplexos específicos baseada no "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA). A técnica se mostrou de grande utilidade na pesquisa do antígeno, do anticorpo e de imunocomplexos específicos no soro de pacientes com esquistossomose hépato-intestinal crônica.

Palavras-chave: antígeno – anticorpo – imunocomplexos – ELISA – esquistossomose

Vários métodos têm sido propostos para a pesquisa e titulação de antígeno, anticorpo e imunocomplexos no sangue circulante e tecidos de pacientes com parasitose (Huldt et al., 1975; Phillips & Draper, 1975; Santoro, Bout & Capron, 1976, Bout et al., 1977, Carlier et al., 1980; Hiat et al., 1980; Santoro et al., 1980, Abdel-Hafez, Phillips & Zodda, 1982). Todavia, a interpretação dos resultados obtidos tem sido dificultada, entre outras razões, por causa do emprego de frações antigênicas mal definidas e pelo fato de se titular, globalmente, os imunocomplexos específicos e inespecíficos, o que não permite a identificação dos seus constituintes, do antígeno e do anticorpo.

Apresentamos, neste trabalho, os resultados obtidos na pesquisa simultânea, na mesma placa, do antígeno, do anticorpo e de imunocomplexos específicos no soro de pacientes com esquistossomose hépato-intestinal crônica. A técnica empregada, por nós desenvolvida (Surerus Campos et al., 1985), baseia-se no "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA).

Usamos como antígeno a fração F1 purificada de um extrato salino de verme adulto de *S. mansoni* (Scapin et al., 1980).

A técnica é de execução simples e bastante sensível.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Soros de pacientes com esquistossomose hépato-intestinal crônica cujos dados clínicos figuram na Tabela I e soros de doadores de sangue com idade de 18 a 25 anos.

2) Antígeno de *S. mansoni*: fração F1 purificada de extrato salino de vermes adultos de *S. mansoni* segundo Scapin et al., 1980, contendo 2,2mg/ml, que essencialmente, consiste nas seguintes etapas: a) obter os vermes adultos de *S. mansoni*, congelá-los em pequeno volume de salina (PBS) durante 24 horas e descongelá-los a 37°C obtendo-se o extrato salino (ES), b) fracionar o extrato ES em coluna de Sephadex G200 (26 x 100) usando-se pressão hidrostática de 20cm de H₂O e fluxo de 12ml/cm²/hr, obtendo-se a fração F1 que é eluída juntamente com o volume de exclusão (V_o) determinada por absorção a 280nm; c) concentrar a fração F1 para o volume desejado e determinar o teor de proteínas.

3) Anti-soros: a) soro de camundongo (pool de 10 animais) anti-*S. mansoni* obtido após três injeções subcutâneas de 15/15 dias de 100µg de fração F1 em adjuvante completo de Freund (ACF); b) fração F(ab')₂ obtida do soro de camundongo anti-*S. mansoni*, pela técnica de Marrack & Richards, 1971, usada como anticorpo de captura; c) soro de coelho anti-F1 de *S. mansoni*, obtido como descrito em (a), usando-se 1000µg do antígeno.

Trabalho realizado com suporte financeiro da FINEP (Convênio FINEP/FIOCRUZ nº 43.83.0625/00/00) e CNPq.

*Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, UFRJ, Ilha do Fundão, 21941 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

**Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

***Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ – Belo Horizonte, MG.

****Centro de Pesquisas Arlindo de Assis – Fundação A. Paiva, Rio de Janeiro, RJ.

Recebido para publicação em 19 de julho de 1985 e aceito em 27 de janeiro de 1986.

TABELA I

Alguns dados sobre os pacientes com a forma clínica da esquistossomose hépato-intestinal

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Carga Parasitária (o/g/f)**
A.O.	18	M	200
A.L.	23	F	158
M.C.	12	F	70
J.S.	20	M	180
L.C.	21	F	220
M.F.	12	F	N.D.*
J.M.	11	M	N.D.
C.M.	20	M	N.D.
J.C.D.	15	M	50
A.S.R.	20	M	200
J.S.A.	12	M	36
W.D.	9	M	288
M.R.O.	11	M	24
W.M.S.	17	M	3278
M.S.S.	16	M	1528
J.E.B.	17	M	2152
H.C.S.	12	M	2806
M.S.M.	11	F	660
M.S.M.	9	M	320
J.S.M.	12	M	625
E.R.M.	17	M	354
C.M.O.	18	M	N.D.

*N.D. = não determinado

**o/g/f = ovos por grama de fezes

4) Soro normal de camundongo adsorvido com hemácias de carneiro e de coelho. A ser adicionado ao diluente (PBST-BSA): a) dos soros de experiência e de controle; b) do soro de coelho anti-*S. mansoni*, na titulação do antígeno; c) dos conjugados anti-IgG humana-peroxidase e anti-IgG de coelho-peroxidase.

5) Conjugados: a) anti-IgG humana-peroxidase (Sigma Chemical Co., USA); b) anti-IgG de coelho-peroxidase (Sigma Chemical Co., USA). Os conjugados são conservados a -20°C em diluição estoque a 1:10 em PBS/glicerol (v/v) contendo 40% de soro normal de camundongo.

6) Imunocomplexos preparados "in vitro": os imunocomplexos foram preparados com anti-soros de coelho usando como antígenos: a) fração F1 obtida de *S. mansoni* (Scapin et al., 1980); b) ovalbumina cinco vezes cristalizada (Sigma Chemical Co., USA); c) antígeno de Leishmania (sobrenadante do sonicado de *L. donovani*). Todos os complexos foram obtidos na zona de equivalência, segundo Kabat & Mayer, 1961, lavados com solução gelada de NaCl a 0,85%, diluídos em soro normal de coelho utilizados em várias diluições.

7) Substrato: solução preparada no momento de uso, contendo 0,4 mg/ml de o-fenileno-diamina, $2\mu\text{l/ml}$ de H_2O_2 em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,6.

8) H_2SO_4 2M usado para interrupção da reação enzimática.

9) Microplacas de poliestireno contendo 96 poços em U.

Padronização dos ensaios:

Foram realizados ensaios preliminares para a determinação das concentrações ótimas dos reagentes (anticorpo de captura, antígeno, soros e conjugados).

Comparando-se os resultados das densidades óticas obtidas com soros positivos e negativos foram escolhidas as maiores diluições que apresentaram diferença acentuada de D.O.

Na pesquisa do antígeno foram preparadas curvas de diluições do antígeno adicionado a um soro de doador e utilizado como controle positivo um dos pontos da curva. A Tabela II apresenta uma das curvas obtidas durante a fase de padronização da pesquisa do antígeno.

As Tabelas III e IV apresentam resultados obtidos na fase de padronização de pesquisa do anticorpo e imunocomplexos específicos. As etapas seguidas na pesquisa do antígeno, anticorpo e imunocomplexos estão apresentadas na Fig. 1.

TABELA II

Padronização de pesquisa de antígeno pelo método ELISA.
Curva de titulação de antígeno (FI de *S. mansoni*) adicionado a soro normal de doador (2,2mg/ml) em diluições sucessivas.
Resultados de densidades óticas obtidas (492nm)

Soro	Densidades óticas (D.O.)			
	Diluições			
	1:50	1:100	1:400	1:800
Soro de doador + FI de <i>S. mansoni</i>	1,546	0,996	0,459	0,336

TABELA III

Padronização da pesquisa de anticorpo no soro de pacientes com esquistossomose. Densidades óticas obtidas empregando-se soros de pacientes e de indivíduos normais de controle em várias diluições

Soros	Densidades óticas (D.O.) 492 nm				
	Diluições dos soros				
Pacientes	Controles	1:100	1:400	1:800	1:1600
F.M.	—	0,400	0,250	0,220	0,200
G.K.	—	0,390	0,240	0,195	0,150
E.C.	—	0,500	0,300	0,214	0,180
A.C.	—	0,550	0,220	0,180	0,150
—	W.M.	0,320	0,150	0,086	0,080
—	D.G.S.	0,200	0,100	0,050	0,045
—	P.B.	0,180	0,120	0,065	0,065
—	T.C.	0,350	0,200	0,096	0,092

TABELA IV

Padronização da pesquisa de imunocomplexos específicos nos soros de pacientes com esquistossomose. Estudos preliminares utilizando soros de pacientes e de indivíduos normais de controle em várias diluições (densidades óticas obtidas 492 nm)

Soros	Densidades óticas (D.O.) 492 nm				
	Diluições dos soros				
Pacientes	Controles	1:100	1:400	1:800	1:1600
F.M.	—	0,400	0,250	0,170	0,165
G.K.	—	0,350	0,200	0,190	0,195
E.C.	—	0,345	0,200	0,160	0,150
A.C.	—	0,300	0,210	0,112	0,110
—	W.M.	0,190	0,150	0,050	0,045
—	D.G.S.	0,290	0,250	0,040	0,040
—	P.B.	0,300	0,150	0,020	0,022
—	T.C.	0,150	0,080	0,009	0,009

Neste trabalho foram escolhidas as concentrações seguintes: anticorpo de captura 1:1000; antígeno 1:800; soros 1:800; soro de coelho anti-*S. mansoni* 1:1000; conjugado anti-IgG humana-peroxidase 1:1000 e anti-IgG de coelho-peroxidase 1:1500.

Triplicatas de "blanks", contendo os reagentes sem soros foram introduzidos em todas as experiências.

SEQUÊNCIA DA TÉCNICA DO "ELISA" PARA A PESQUISA SIMULTÂNEA DE ANTÍGENO, ANTICORPO E IMUNOCOMPLEXO

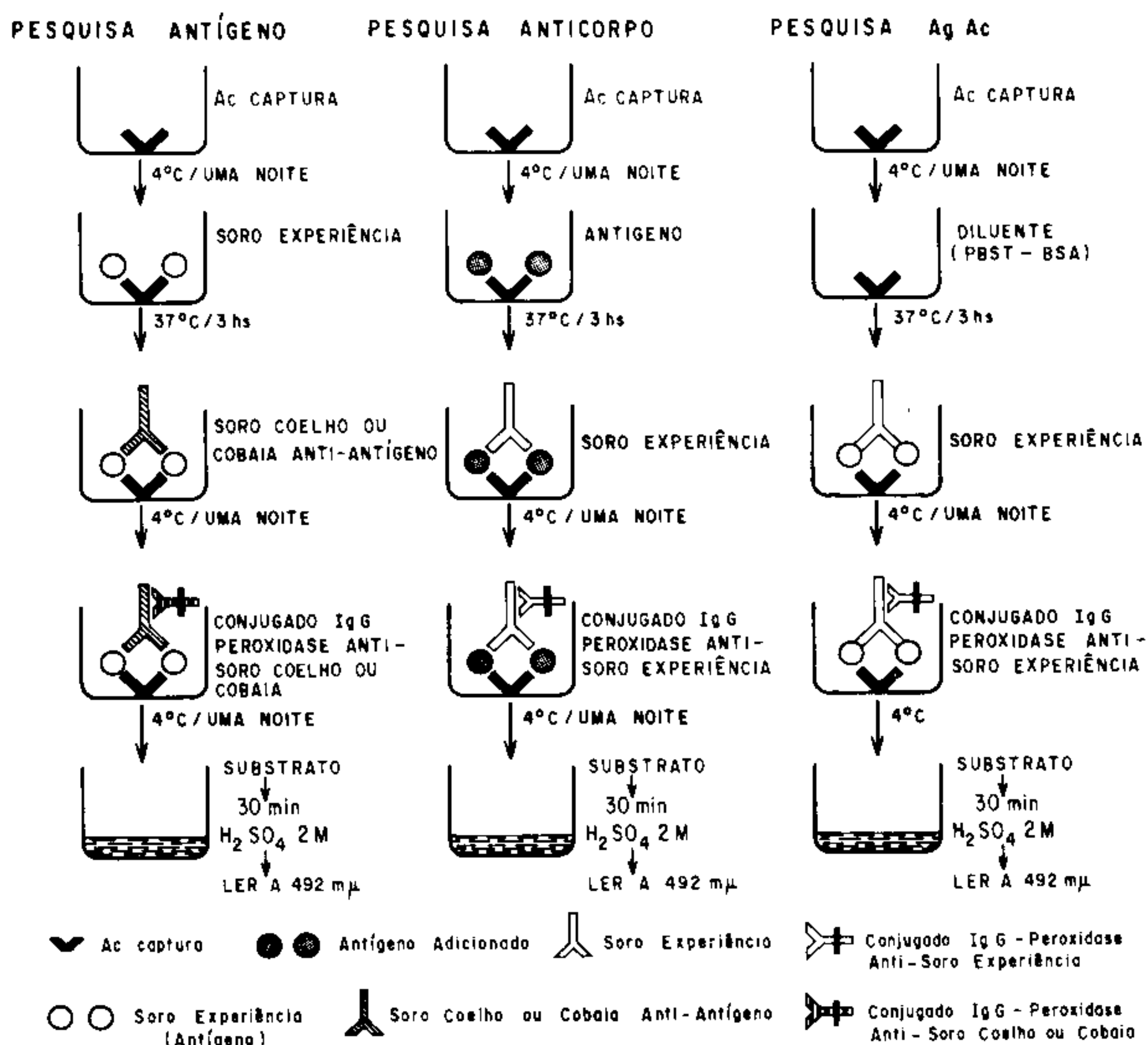


Fig. 1: etapas principais da pesquisa simultânea de antígeno, anticorpo e imunocomplexos específicos.

Imunoensaio:

Preparo das microplacas com anticorpo F(ab')₂ de captura:

- 1) Adicionar 100μl do soro de captura diluído 1:1000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,2M pH 9,6 a todos os poços da placa;
- 2) Incubar a 4°C até o dia seguinte, aspirar o líquido, lavar os poços três vezes com 100μl de tampão salina fosfato 0,15M pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e aspirar o líquido sobrenadante;
- 3) Usar a microplaca de acordo com o esquema seguinte: filas A e D: pesquisa de antígeno; filas B e E: pesquisa de anticorpo; filas C e F: pesquisa de imunocomplexos; filas G e H: para "blanks", controles positivos e negativos.

Pesquisa do antígeno:

1) Adicionar 100 μ l dos soros diluídos a 1:800 (soros de experiência, soros de doadores normais e de controle positivo) em triplicata. Nos poços de "blank" adicionar apenas o diluente.

2) Incubar a 37°C durante três horas, lavar, esvaziar os poços e ajuntar 100 μ l do soro de coelho anti-*S. mansoni* diluído a 1:1000 e incubar a 4°C até o dia seguinte.

3) Lavar e esgotar o líquido sobrenadante, adicionar 100 μ l do conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase diluído a 1:1500 e incubar a 4°C até o dia seguinte.

4) Lavar e esgotar os poços, adicionar 100 μ l do substrato, aguardar 30 minutos e interromper a reação enzimática com 50 μ l de H₂SO₄ 2M. Ler as D.O. a 492nm.

Pesquisa do anticorpo:

1) Adicionar 100 μ l de solução do antígeno (fração F1) diluído a 1:800, incubar a 37°C durante três horas, lavar os poços, esgotar e ajuntar, em triplicata, 100 μ l dos soros diluídos a 1:800 (soros de experiência, soros de controle normais e de controle positivo). Em três poços adicionar apenas diluente ("blank").

2) Incubar a 4°C até o dia seguinte, lavar e esgotar os poços e ajuntar 100 μ l do conjugado anti-IgG humana-peroxidase diluído a 1:1000. Incubar a 4°C por 18 horas, lavar e esgotar.

3) Adicionar 100 μ l da solução do substrato, aguardar 30 minutos e interromper a reação enzimática pela adição de 50 μ l de H₂SO₄ 2M. Ler a D.O. a 492nm.

Pesquisa de imunocomplexos:

1) Adicionar 100 μ l de PBST-BSA, incubar a 37°C por três horas, lavar e esgotar o sobrenadante e ajuntar 100 μ l dos soros diluídos a 1:800 (soros de experiência, soros de controle normal e controle positivo) em triplicatas. Nos poços "blank" adicionar apenas o diluente.

2) Incubar a 4°C até o dia seguinte, lavar e esgotar os poços, adicionar 100 μ l do conjugado anti-IgG humana-peroxidase a 1:1000 e incubar a 4°C até o dia seguinte.

3) Lavar a placa, adicionar 100 μ l da solução do substrato, aguardar 30 minutos e interromper a reação enzimática pela adição de 50 μ l de H₂SO₄ 2M. Ler as D.O. a 492nm.

RESULTADOS

Os resultados do estudo de 22 soros de pacientes com esquistossomose hépato-intestinal crônica e de 22 soros de doadores normais estão apresentados nas Tabelas V e VI.

A pesquisa simultânea do antígeno, do anticorpo e de imunocomplexos específicos nos soros dos pacientes estudados apresentou resultados significativamente diferentes daqueles obtidos com os soros normais ($p < 0,005$).

As médias das densidades óticas (D.O.) na pesquisa de antígeno, anticorpo e imunocomplexos específicos foram as seguintes: antígeno $0,052 \pm 0,010$ contra zero para o soro normal; anticorpo $0,133 \pm 0,066$ contra $0,037 \pm 0,020$ para o soro normal; imunocomplexos $0,096 \pm 0,040$ contra $0,026 \pm 0,016$ para o soro normal.

Com o intuito de mostrar a especificidade do método empregado na detecção de imunocomplexos específicos na esquistossomose realizamos, paralelamente, a pesquisa de imunocomplexos preparados "in vitro" (*S. mansoni*-anti-*S. mansoni*, *L. donovani*-anti-*L. donovani* e ovalbumina-anti-ovalbumina) adicionados à placa contendo anticorpo de captura específico para *S. mansoni*.

Conforme se poderá ver nas Figs. 2 e 3, não foi possível revelar a presença de imunocomplexos inespecíficos.

DISCUSSÃO

No decurso da infecção pelo *S. mansoni* o sistema imune do hospedeiro entra em íntimo contato com inúmeras substâncias, metabólicas e somáticas, provenientes do parasita e de seus ovos.

Essas substâncias, com propriedades físico-químicas diversas, podem funcionar como imunógenos, ou como mitógenos, capazes de induzir estimulação monoclonal ou policlonal dos dois braços do sistema imune, o humoral e o celular.

TABELA V

Resultados individuais da pesquisa de antígeno, anticorpo e imunocomplexos específicos no soro de pacientes com esquistossomose hépato-intestinal.

Pacientes	Sexo	Antígeno (D.O.)	Anticorpo (D.O.)	Imunocomplexos (D.O.)
A.O.	M	0,045	0,179	0,171
A.L.	F	0,069	0,197	0,124
M.C.	F	0,069	0,163	0,077
J.S.	M	0,055	0,180	0,110
L.C.	F	0,030	0,140	0,082
M.F.	F	0,030	0,149	0,067
J.M.	M	0,050	0,104	0,049
C.M.	M	0,040	0,069	0,040
J.C.D.	M	0,050	0,217	0,127
A.S.R.	M	0,060	0,044	0,112
J.S.A.	M	0,055	0,113	0,079
W.D.	M	0,060	0,106	0,070
M.R.O.	M	0,065	0,193	0,160
W.M.S.	M	0,055	0,213	0,160
M.S.S.	M	0,065	0,060	0,087
J.E.B.	M	0,065	0,086	0,100
H.C.S.	M	0,061	0,192	0,160
M.S.M.	F	0,056	0,090	0,048
M.S.M.	M	0,050	0,123	0,100
J.S.M.	M	0,044	0,097	0,036
E.R.M.	M	0,040	0,083	0,100
C.M.O.	M	0,040	0,139	0,045
Médias ± Desvios padrões		0,052 ± 0,010	0,133 ± 0,066	0,096 ± 0,040

TABELA VI

Resultados individuais da pesquisa de antígeno, anticorpo e imunocomplexos específicos no soro de doadores normais de sangue (B. Sangue do IPPMG)

Doadores	Sexo	Antígeno (D.O.)	Anticorpo (D.O.)	Imunocomplexos (D.O.)
P.B.	M	0	0,052	0,044
A.O.	F	0	0,026	0,018
L.C.B.D.	M	0	0,040	0,040
P.R.F.F.	M	0	0,035	0,040
A.C.L.M.	F	0	0,050	0,054
D.C.	F	0	0	0,016
A.C.	F	0	0,010	0,030
B.C.	M	0	0,030	0
J.O.N.	M	0	0,043	0,020
F.M.C.	F	0	0,065	0,030
J.F.S.	M	0	0,060	0,030
D.P.G.	M	0	0,060	0,020
R.A.	M	0	0,086	0,046
D.G.	M	0	0,048	0,024
R.L.A.	M	0	0,016	0
A.G.S.	M	0	0,032	0,043
J.L.	M	0	0,021	0,052
R.G.G.	M	0,004	0,032	0,017
F.F.N.	M	0	0,033	0,004
A.L.O.B.	M	0,003	0,043	0,037
G.K.	F	0,003	0,020	0,008
A.C.	F	0,002	0,020	0,009
Médias ± Desvios padrões		0	0,037 ± 0,020	0,026 ± 0,016

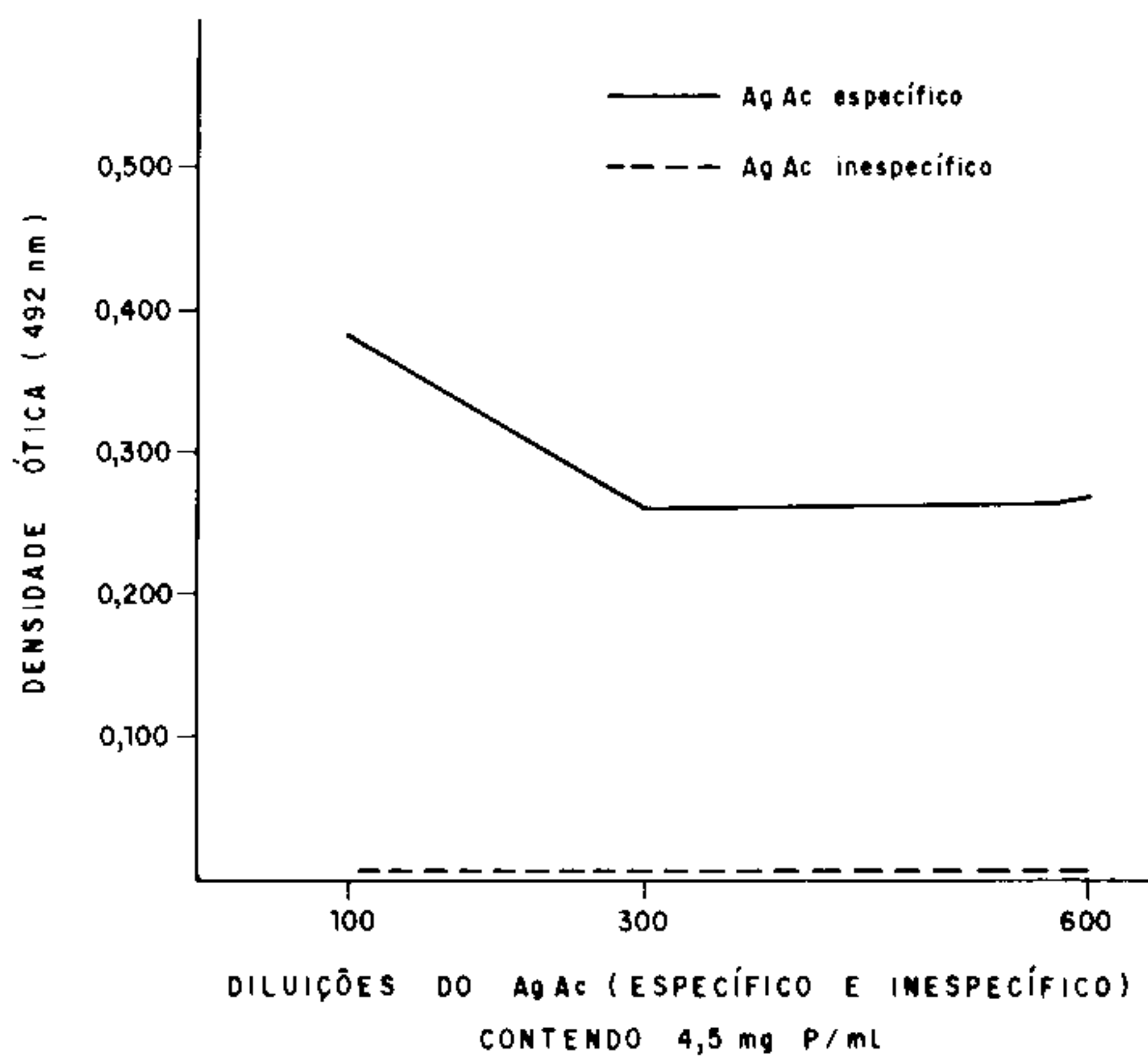


Fig. 2: pesquisa de imunocomplexos específicos (*S. mansoni*-anti-*S. mansoni*) e inespecíficos (*L. donovani*-anti-*L. donovani*) adicionados a soro normal de coelho em presença de anticorpo de captura (camundongo anti-*S. mansoni*).

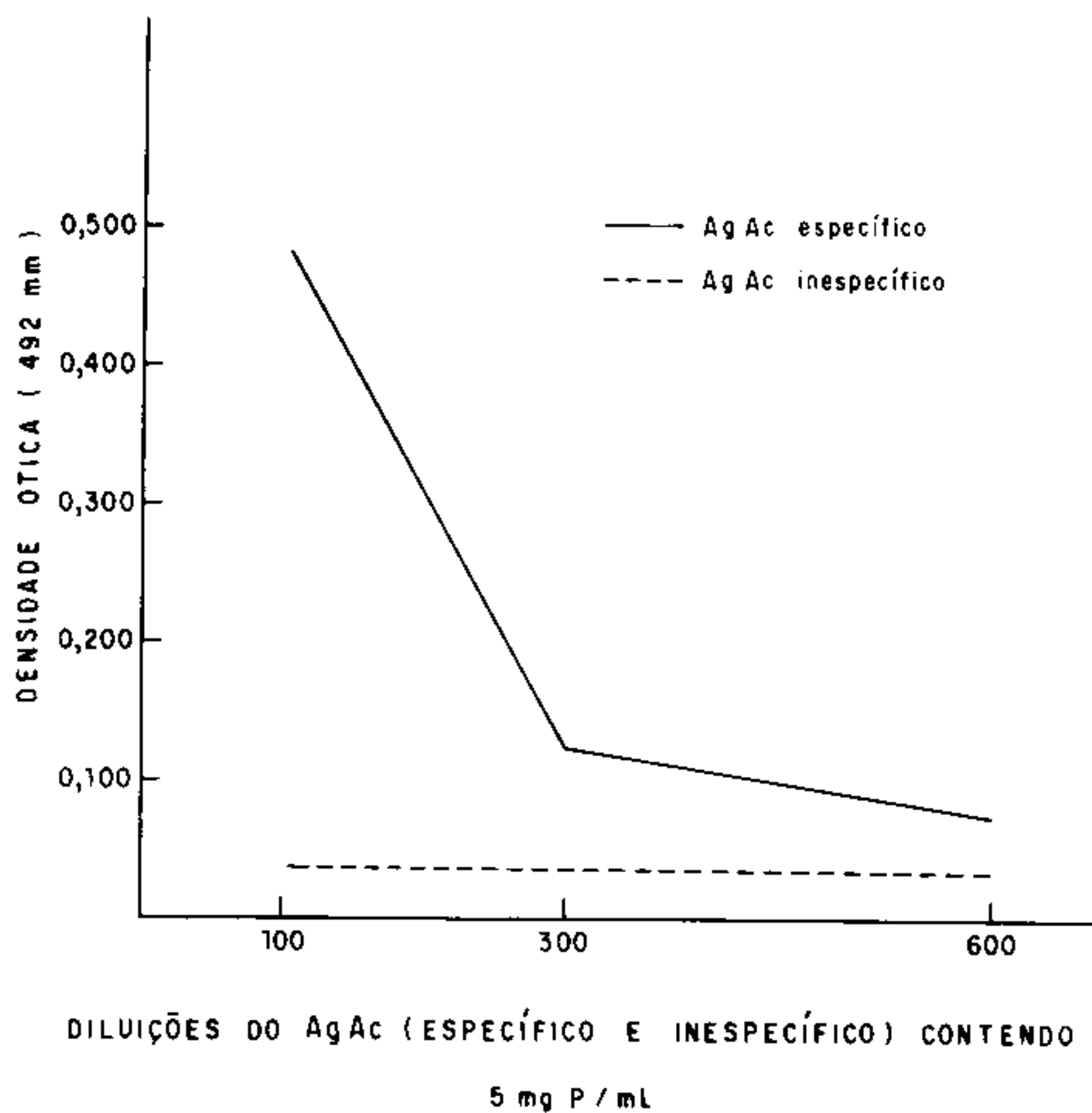


Fig. 3: pesquisa de imunocomplexos específicos (*S. mansoni*-anti-*S. mansoni*) e inespecíficos (ovalbumina-anti-ovalbumina) adicionados a soro normal de coelho em presença de anticorpo de captura (camundongo anti-*S. mansoni*).

A formação de anticorpos convencionais (Ac1: contra antígenos do parasita), de anticorpos anti-isotipos (F. Reumatoide) e anti-idiotipo (Ac2) e dos respectivos imunocomplexos resultantes dessa imunoestimulação, constituem achados freqüentes nas fases aguda e crônica da infecção pelo *S. mansoni* (Andrade & Marck, 1984).

Vários métodos têm sido empregados na pesquisa do antígeno, do anticorpo ou de imunocomplexos (Hiatt et al., 1980; Lawley et al., 1979; Santoro, Wandermeulebroucke & Capron, 1979; Smith et al., 1977), no sangue circulante e tecidos dos pacientes com esquistossomose.

Todavia, a interpretação dos resultados obtidos tem sido dificultada por várias razões: 1) pelo emprego de frações antigênicas mal definidas (extratos totais de vermes adultos ou seus ultracentrifugados; extratos de tegumento dos vermes; antígenos secretados ou excretados pelo parasita; extratos totais de ovos; extratos de cercárias, etc.). Esta conduta tem dificultado o esclarecimento do significado dos antígenos, dos anticorpos e imunocomplexos específicos no mecanismo patogênico e na resistência da infecção por *S. mansoni*; 2) pelo fato de se titular, em geral, apenas os imunocomplexos de composição indefinida (inespecíficos), o que não permite identificar a natureza dos seus constituintes (antígeno e anticorpo).

Desde que imunocomplexos podem se formar no decurso da infecção por inúmeros parasitas às custas de anticorpos convencionais (Ac1), de anticorpos anti-idiotipos (Ac2) (Rose, Goldman & Lambert, 1982), ou anti-isótipos (FR), de outros auto-anticorpos (Hillyer, 1972), ou mesmo às custas do anticorpo contra antígenos provenientes de outros parasitas que não o *S. mansoni*, não tem sido possível obter informações seguras sobre a natureza dos antígenos existentes nos imunocomplexos titulados pelas técnicas usuais.

O método para a pesquisa de imunocomplexos idealizado por Phillips & Draper (1975), baseado na acidificação do soro em estudo seguida de contraímunoeletroforese dupla em meio hipertônico, realmente possibilita a detecção de imunocomplexos específicos, mas a baixa sensibilidade do método torna-o pouco recomendável para os trabalhos de pesquisa. É imperioso, portanto, que se desenvolvam meios de se pesquisar, não somente os anticorpos específicos mas, também, os antígenos específicos do sangue e tecidos do animal infectado e os imunocomplexos formados às custas dos antígenos do parasita.

As técnicas baseadas no método ELISA (Kelsoe & Weller, 1978; Hillyer & Rios, 1979; Deedler et al., 1980) têm merecido grande atenção no diagnóstico das doenças parasitárias, pois que o método apresenta sensibilidade semelhante à do radioimunoensaio correntemente empregado (Santoro et al., 1978).

Todavia, nenhuma dessas técnicas foi, até agora, adaptada para a pesquisa simultânea de antígeno, anticorpo e imunocomplexos específicos.

A técnica por nós desenvolvida, baseada no método de ELISA (Engvall & Perlmann, 1971), possibilitou a pesquisa simultânea de antígeno, anticorpo e imunocomplexos específicos, na mesma microplaca, usando como anticorpo de captura F(ab')₂ de camundongo, e, como antígeno, a fração purificada (F1) de um extrato salino de vermes adultos de *S. mansoni* (Scapin et al., 1980).

Há evidências que a fração imunogênica F1 provenha do tegumento do verme adulto.

Pesquisas recentes mostram que essa fração F1 pode ainda ser decomposta em três outros componentes (A, B, C), mas ainda não dispomos de dados sobre sua importância na imunopatologia da doença. À medida que outros antígenos provenientes do parasita, e de seus ovos, sejam obtidos em forma e com o uso de anticorpo monoclonal, poder-se-á, com a técnica ora desenvolvida, titular no sangue e tecidos os imunocomplexos específicos de maior interesse na patogenia das lesões teciduais encontradas na esquistossomose.

As imunoglobulinas com as características dos anticorpos anti-idiotipos (Ac2) e que possuem "imagem interna do antígeno", também poderiam ser reveladas por ocasião da pesquisa do antígeno. Como se sabe, esses anticorpos Ac2, com imagem interna do antígeno, possuem estrutura semelhante à do epítotope com o qual reage de modo cruzado. Esses Ac2 com imagem interna do antígeno também chamados Ac2-beta (Jeme) ou "homobodies" (Lindermann), possuem determinadas atividades biológicas que imitam não somente a função fisiológica do antígeno mas, também, sua configuração estérica.

Entre as vantagens da técnica ora apresentada poderíamos citar as seguintes: 1) permitir a pesquisa simultânea, na mesma placa, do antígeno, do anticorpo e de imunocomplexos específicos; 2) evitar o uso de radionuclídeos, de células vivas e de complemento; 3) ser de execução simples, bastante sensível e se prestar para estudos em todos os líquidos biológicos.

SUMMARY

The main steps of a sensitive and quantitative technique for the simultaneous determination, in the same microplate, of antigen, antibody and specific immune complexes has been described. The assay involved principles of the double sandwich technique used in the "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA). The technique proved to be useful for the estimation of antigen, antibody and specific immune complexes in sera of patients with human chronic hepato-intestinal schistosomiasis.

Key words: antigen – antibody – immune complexes – ELISA – schistosomiasis

AGRADECIMENTOS

Desejamos agradecer o valioso apoio que nos deu o Prof. Hélio Gelli Pereira durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAFEZ, S.K.; PHILLIPS, S.M. & ZODDA, D.M., 1982. *Schistosoma mansoni*: Detection and characterization of antigens and antigenemia by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Exper. Parasitol.*, 55 :219-232.
- ANDRADE, Z.A. & MARCK, E.V., 1984. Schistosomal glomerular disease (A Review). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79 :499-506.
- BOUT, D.; SANTORO, F.; CARLIER, T.; BINA, J.C. & CAPRON, A., 1977. Circulating immune complexes in Schistosomiasis. *Immunology*, 33 :17-22.
- CARLIER, Y.; NZEYIMANA, H.; BOUT, D. & CAPRON, A., 1980. Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes in *Schistosoma mansoni* infected African parturients and their newborn children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29 :74-81.
- DEEDLER, A.M.; KORNELIS, D.; MARBIN, M.; NOORDPOOL, H.N.; GODFRIED, R.M.; ROTMANS, J.P. & OOSTBURG, B.F.J., 1980. Applicability of different antigen preparations in the enzyme-linked immunosorbent assay for *Schistosomiasis mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29 :401-410.
- ENGVALL, F. & PERLMANN, P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 109 :129-135.
- HIATT, R.A.; OTTESEN, E.A.; SOTOMAYOR, Z.R. & LAWLEY, T.J., 1980. Serial observations of circulating immune complexes in patients with acute schistosomiasis. *J. Infect. Dis.*, 142 :665-670.
- HILLYER, G.V., 1972. Schistosoma deoxyribonucleic acid (DNA) antibodies to DNA in schistosoma infection and their possible role in renal pathology. *Bol. Assoc. Med. P. Rico*, 66 :1-22.
- HILLYER, G.V. & RIOS, I.G., 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of Schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28 :237-241.
- HULDT, G.; LAGERQUIST, B.; PHILLIPS, T.; DRAPER, C.C. & VOLLER, A., 1975. Detection of antibodies in schistosomiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am. Trop. Med. Parasit.*, 69 :483-488.
- KABAT, E.A. & MAYER, M.M., 1961. Experimental Immunochemistry. Charles C. Thomas. Springfield.
- KELSOE, G.H. & WELLER, T.H., 1978. Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to circulating antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 :5715-5717.
- LAWLEY, T.J.; OTTESEN, E.A.; HIATT, R.A. & GAZZE, L.A., 1979. Circulating immune complexes in acute schistosomiasis. *Clin. Exp. Immunol.*, 37 :221-227.
- MARRACK, J.R. & RICHARDS, C.B., 1971. Light-scattering studies of the formation of aggregates in mixtures of antigen and antibody. *Immunology*, 20 :1019-1049.
- PHILLIPS, T.M. & DRAPER, C.C., 1975. Circulating immune complexes in schistosomiasis due to *Schistosoma mansoni*. *Brit. Med. J.*, 2 :476-477.
- ROSE, L.M.; GOLDMAN, M. & LAMBERT, P.H., 1982. The production of anti-idiotypic antibodies and of idiotype-anti-idiotypic immune complexes after polyclonal activation induced by bacterial LPS. *J. Immunol.*, 128 :2126-2133.
- SANTORO, F.; BOUT, D. & CAPRON, A., 1976. Imunocomplexos na esquistossomose. II. Dosagem radioimunológica da ligação do Clq I¹²⁵ ao imunocomplexo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18 :293-297.
- SANTORO, F.; BOUT, D.; WATTRE, P. & CAPRON, A., 1976. Imunocomplexos na esquistossomose. I. Utilização da fixação do complemento para sua detecção. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18 :152-156.
- SANTORO, F.; CAPRON, M.; JOSEPH, M.; ROUSSEU-PREVOST, R. & CAPRON, A., 1978. Circulating antigens and immune complexes in *Schistosoma mansoni*-infected rats. Characterization by radioimmuno-precipitation PEG assay (RIPEGA). *Clin. Exp. Immunol.*, 32 :435-442.
- SANTORO, F.; PRATA, A.; CASTRO, C.N. & CAPRON, A., 1980. Circulating antigens, immune-complexes and C3d levels in human schistosomiasis: relationship with *Schistosoma mansoni* egg output. *Clin. Exp. Immunol.*, 42 :219-225.

- SANTORO, F.; WANDERMEULEBROUCKE, B. & CAPRON, A., 1979. *Schistosoma mansoni*: Circulating antigens and immune-complexes in infected mice. *Exper. Parasit.*, 47 :392-402.
- SCAPIN, M.; TENDLER, M.; MESSINEO, L. & KATZ, N., 1980. Preliminary studies with *Schistosoma mansoni* saline extract inducing protection in rabbits against the challenge infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22 :164-172.
- SMITH, M.D.; VERROUST, P.J.; MOREL-MAROGER, L.; GENITEAU, M. & COULAUD, J.P., 1977. A study of the presence of circulating immune complexes in schistosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71 :343-348.
- SURERUS CAMPOS, D.; QUEIROZ DA CRUZ, M.; RODRIGUES, R.M.S. & OLIVEIRA LIMA, A., 1985. Desenvolvimento de uma técnica para a titulação simultânea, na mesma placa, de antígeno, anticorpo e imunocomplexos específicos. Fundação Ataulpho de Paiva. Rio de Janeiro.