

MÉTODO RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE FRAÇÃO ANTIGÊNICA DE VERMES ADULTOS DE SCHISTOSOMA MANSONI *

Mauro Scapin ** e Miriam Tendler ***

Fração antigênica de Schistosoma mansoni obtida a partir de vermes adultos, precipitou em 35 minutos com soros de doentes com esquistossomose mansônica e tornou-se visível sem coloração, utilizando-se o método de imunoelctrosmoforese (I.E.O.F.).

INTRODUÇÃO

A estrutura antigênica de formas adultas de *Schistosoma mansoni*, helminto responsável pela esquistossomose mansônica, grave parasitose que ocorre endemicamente em extensas áreas de nosso país e encontra-se ainda em expansão, vem sendo exaustivamente estudada, visando sua caracterização imunológica e bioquímica, purificação e obtenção de antígenos específicos.

Em 1962, Biguet e Capron (1) identificaram, através de estudo eletroforético e imunoelctroforético, componentes antigênicos de extrato salino de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Kent (10), em 1963, pesquisou comparativamente extratos aquosos de formas adultas e larvares de *S. mansoni*, estudando seus constituintes, bem como seu potencial antigênico, através de dupla imunodifusão em gel de agar, contra soros hu-

manos e de animais infectados com *S. mansoni*.

Seguiram-se a estas inúmeras outras pesquisas imunológicas da citada helmintíase, tendo como base os métodos de dupla imunodifusão e imunoelctroforese (2, 4, 8, 10, 14, 15, 16, 17).

Presentemente, em nosso laboratório, no curso de pesquisa imunológica sobre os constituintes antigênicos do *S. mansoni* (exemplares machos e fêmeas de vermes adultos), tivemos a oportunidade de utilizar a técnica de imunoelctrosmoforese (I.E.O.F.), que nos parece, sob vários aspectos, a exemplo de procedimentos semelhantes empregados para estudos de amebíase (11) e triquinose (5), grandemente vantajosa, e a qual passamos a descrever.

MATERIAL E MÉTODOS

Cobaias adultas, em número de 10 (dez), foram experimentalmente infecta-

* Trabalho realizado no Instituto Gonzaga da Gama Filho da Universidade Gama Filho (UGF) e Instituto de Endemias Rurais da F.I.O. Cruz — M.S.

** Professor Assistente do Departamento de Biofísica e do Instituto Gonzaga da Gama Filho da UGF.

*** Médica do Instituto de Endemias Rurais — F.I.O. Cruz — M.S. e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

Recebido para publicação em 17-10-1974.

das com 3 banhos, ricos em cercárias eliminadas por *Biomphalaria glabrata* e, após 45 dias de infecção, os vermes adultos foram recolhidos por perfusão do fígado e sistema porta (13) e conservados a -18°C por 24 hs. em 5 ml. de solução de NaCl 0,15M com merthiolato 1:10.000.

O extrato de vermes adultos, usado como antígeno, foi obtido a partir de 275 mg de vermes secos, em suspensão de 3,5 ml. de NaCl 0,15M, contendo 1:10.000 de merthiolato, a partir de homogeneização a 750 rpm durante 5 min. com o homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem (15). No sentido de eliminar restos de membrana e partículas subcelulares, o extrato de vermes foi submetido a centrifugação de 1.500 rpm por 5 min. e 10.000 rpm por 60 min. Para clarificação total, o sobrenadante desta última etapa foi passado através de filtro Millipore com poro de $0,22\ \mu$. Todos estes procedimentos foram levados a efeito em temperatura em torno de 4°C .

Soros obtidos de portadores de esquistossomose mansônica, oriundos de áreas endêmicas brasileiras, cujo diagnóstico foi feito por exame coprológico pelo método de Hoffman, Pons & Janer (7), foram usados como fonte de possíveis anticorpos.

A técnica por nós utilizada foi uma modificação do método de Pesendorf, Krasnitsky & Wewalka (19) empregado para aumentar a sensibilidade e velocidade de detecção de complexos antígeno-anticorpo, usada em diagnóstico de Antígeno-Austrália (6), tendo sido a terminologia

(I.E.O.F.) usada por Novak, Köszegehy & Penke (12).

Duas lâminas de vidro de microscopia de $7,0 \times 2,6\ \text{cm}$ foram cobertas com 2 ml/lam., de agar (Difco) a 0,75% em "sodium barbital acetate buffer", pH 8,4; 0,13M (19). Após a gelificação, foram feitos 4 orifícios em cada lâmina, dispostos conforme Fig. 1.

As lâminas prontas, foram colocadas em uma cuba para eletroforese com capacidade para 2 lâminas e a conexão elétrica entre o gel e o buffer de cada extremidade da cuba, feita com papel filtro Whatman n.º 1.

Os 4 orifícios das 2 lâminas próximas ao catodo foram preenchidos com 2,3 ml de extrato e nos outros orifícios foram colocados a mesma quantidade de 4 diferentes soros de doentes esquistossomóticos, que haviam apresentado uma linha de precipitação em gel de Agarose a 1% em H_2O destilada, quando submetido à técnica de dupla imunodifusão, contra o mesmo extrato em questão, pelo método de Ouchterlony (3). Imediatamente após a colocação dos soros, o método de I.E.O.F. foi iniciado, à temperatura ambiente, conduzindo corrente contínua no gel de 11 mA/lâmina.

RESULTADOS

A linha de precipitação obtida pela I.E.O.F. foi visualizada entre cada 2 orifícios dispostos longitudinalmente (Fig. 2), 35 min. após a condução da corrente elétrica e sem que fosse necessária a retirada

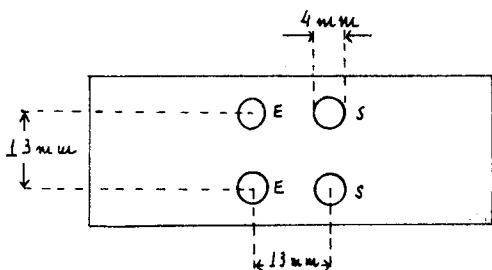


Fig. 1 — orifício no gel de agar sobre lâmina.

E = extrato obtido de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, utilizado como antígeno.

S = soro de doente esquistossomótico, utilizado como fonte de possíveis anticorpos.

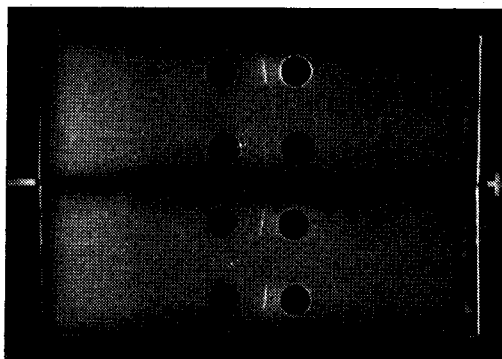


Fig. 2 — I.E.O.F. em gel de agar. Demonstração das linhas de precipitação dispensando coloração das lâminas.

das lâminas de vidro, da cuba. Entretanto, para melhorar a visualização, utilizamo-nos de iluminação oblíqua, conforme descrito anteriormente (19). Todos os 4 soros examinados apresentaram linha de precipitação facilmente visualizada, confirmando as provas positivas obtidas pela técnica de Ouchterlony.

CONCLUSÕES

Devido à localização do precipitado, concluímos que a fração antigênica tem migração semelhante à albumina e o anticorpo estaria na fração gama do soro.

O curto tempo (35 min.) em que foi realizado o método (I.E.O.F.); a rápida e fácil visualização dos resultados (dispensa coloração); a possibilidade de reduzir ainda mais o tempo de execução do método para 10 ou 15 minutos (aumentando-se a intensidade da corrente para 20 ou 25 mA), a utilização simultânea de diver-

sos soros (em placas de vidro de maiores dimensões), mostram ser o método de valia na detecção de frações antigênicas solúveis de formas adultas de *Schistosoma mansoni* oferecendo vantagens sobre outros métodos de imunodifusão e imuno-elektroforese, habitualmente empregados no seu estudo.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao Prof. Gobert de Araújo Costa, Diretor do Instituto Gonzaga da Gama Filho e ao Dr. Celso Arcoverde de Freitas, Diretor do Instituto de Endemias Rurais.

Agradecemos aos departamentos de Zoologia Médica (Helminologia) e Patologia e Doenças Tropicais (Fisiopatologia) do Instituto Oswaldo Cruz, pela colaboração prestada no que se refere à obtenção do material (verme adulto de *S. mansoni*) utilizado no presente trabalho.

S U M M A R Y

An antigenic fraction of Schistosoma mansoni, obtained from adult worms, has precipitated within 35 minutes with human sera from schistosomotic patients and became visible without staining, using the immunoelectroosmophoretic method (I.E.O.F.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGUET, J., CAPRON, A. & TRAN VAN KY, P. — Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. 1. Étude électrophorétique et immunoelectrophorétique. Caractérisation des antigènes spécifiques. *Ann. Inst. Past.*, 103: 763-777, 1962.
- CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. — "Host" antigens associated with *Schistosomes*: observations on their attachment and their nature. *Parasitology*, 61: 87-94, 1970.
- CLAUSEN, J. — Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. In: WORK, T.S. & WORK, E. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdam, North Holland Publishing Company, 3: 397-557, 1969.
- DAMIAN, R.T. — Common antigens between adult *Schistosoma mansoni* and the laboratory mouse. *J. Parasitol.*, 53: 60-64, 1967.
- DESPOMMIER, D., MULLER, M., JENKS, B. & FRUITSTONE, M. — Immunodiagnosis of human trichinosis using counter-electrophoresis and agar gel diffusion techniques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23: 41-44, 1974.
- GOCKE, D.J. & HOME, — Rapid detection of Australia Antigen by counter-immunoelectrophoresis. *J. Immunol.*, 104: 1031-1032, 1970.
- HOFFMAN, W.A., PONS, J.A. & JANNER, J.L. — The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. *The Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med.*, 9: 283, 1934.

8. HYLLEYER, G.V. & RITCHIE, L.S. — Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* Infections: II. *Cercopithecus sabaens* and *Macaca mulata* Monkeys. *Exp. Parasit.*, 20: 326-333, 1967.
9. KAGAN, I.G. & NORMAN, L. — Analysis of helminth antigens (*Echinococcus granulosus* and *Schistosoma mansoni*) by agar gel methods. *Ann. New York Acad. Sc.*, 113: 130-153, 1963.
10. KENT, N.H. — Comparative immunochemistry of larval and adult forms of *Schistosoma mansoni*. *Ann. New York Acad. Sc.*, 113: 100-113, 1963.
11. KRUPP, I.M. — Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic test in the diagnosis of amebiasis. *The Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 23: 27-30, 1974.
12. NOVAK, E., KÖSZEGHY, S. & PENKE, S. — Screening of blood donors for Australia Antigen by Immunoelectroosmophoresis. *Hung. Sc. Instr.*, 29: 37-40, 1974.
13. PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A.F. Técnica de perfusão de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev. Bras. Malar. Doenças Trop.*, 8: 590-596, 1953.
14. SADUN, E.H., SCHOENBECHLER, M.J. & BENTZ, M. — Multiple antibody response in *Schistosoma mansoni* infections: antigenic constituents in eggs, cercariae and adults (excretions and secretions) determined by flocculations, reactions, cross absorption and double diffusion. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 6: 977-995, 1965.
15. SILVA, L.C. & FERRI, R.G. — Immunodiffusion studies in human *Schistosomiasis mansoni*. I. Hepato-intestinal and hepatoesplenic forms. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 1-6, 1965.
16. SILVA, L.C. & FERRI, R.G. — Immunodiffusion studies in human *Schistosomiasis mansoni*. II. Localization of antibodies by immunoelectrophoresis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 7-10, 1965.
17. SMITHERS, S.R. — Gel diffusion studies on *Schistosoma mansoni*. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 54: 3, 1960.
18. SMITHERS, S.R. & WILLIAMSON, J. — Antigenic polysaccharide material in cercariae and eggs of *Schistosoma mansoni*. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 55: 308-309, 1961.
19. Viral hepatitis and tests for the Australia (Hepatitis-associated) antigen and antibody. *Bull. World Health Organ.*, 42: 974 — 992, 1970.