

## PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-SCHISTOSOMA MANSONI PELA TÉCNICA ANTI-GLOBULÍNICA DE IMUNOPEROXIDASE. COMPARAÇÃO COM AS REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E DE HEMAGLUTINAÇÃO

Antonio Walter FERREIRA (1), Mario E. CAMARGO (2) e Oswaldo S. NAKAHARA (3)

### RESUMO

A técnica imunoenzimática com anticorpos antiglobulina marcados pela peroxidase foi aplicada ao diagnóstico sorológico da esquistossomose. Preparou-se e caracterizou-se o conjugado enzimático pelos parâmetros de intensidade de marcação e atividade imune e determinou-se, para uso nas reações, a maior diluição apresentando reatividade máxima. Em soros de 25 portadores de esquistossomose a reação de imunoperoxidase foi positiva, enquanto negativa em soros de 20 não-esquistossomóticos, normais ou portadores de outras afecções, inclusive parasitárias. Os títulos em geral foram concordantes ou mesmo superiores aos da reação de imunofluorescência. Com relação aos títulos hemaglutinantes, os títulos imunoenzimáticos foram em geral inferiores. A estabilidade dos preparados, sua nitidez e possibilidade de observação em microscopia de iluminação comum, representam vantagens sobre a técnica imunofluorescente.

### INTRODUÇÃO

A marcação de moléculas de imunoglobulinas por enzimas, introduzida por AVRAMEAS & URIEL<sup>3</sup> e por NAKANE & PIERCE<sup>14</sup>, veio permitir a evidênciação de reações antígeno-anticorpo, de maneira semelhante às técnicas imunofluorescentes. As técnicas imunoenzimáticas têm sido aplicadas não apenas para a pesquisa e localização de componentes antigênicos de células ou tecidos mas ainda, para a evidênciação de anticorpos séricos, no diagnóstico de infecções bacterianas<sup>16</sup> ou parasitárias<sup>15, 9</sup>, bem como na pesquisa de auto-anticorpos<sup>4, 7</sup>. Embora diferentes enzimas possam ser utilizadas<sup>2, 11</sup>, tem sido preferida a peroxidase do rábano silvestre (horse-radish peroxidase), pela maior atividade enzimática dos conjugados resultantes<sup>17</sup>.

Nesta publicação relatamos a aplicação da técnica de imunoperoxidase na pesquisa de anticorpos anti-*Schistosoma mansoni* e comparamos os resultados com os de duas outras técnicas para o diagnóstico sorológico da esquistossomose, as reações de imunofluorescência<sup>16</sup> e de hemaglutinação<sup>12</sup>.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### A - Soros

Foram incluídos no estudo, 25 soros de portadores de esquistossomose parasitologicamente diagnosticada e 20 soros de pacientes não portadores da parasitose. Essas amostras mantiveram-se congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por diferentes períodos, de dias a alguns meses. Para

Trabalho realizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e apresentado no X Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Curitiba, fevereiro de 1974.

- (1) Professor Assistente Doutor, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- (2) Professor Assistente Doutor, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- (3) Acadêmico, Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo.

as reações, degelavam-se alíquotas dos soros, que eram então diluídas em PBS (NaCl 0,15M; fosfatos 0,01M, pH 7,2) na razão 2, a partir de 1:20.

#### B — Reação de imunoperoxidase

*Antígeno* — As reações se faziam com partículas de vermes adultos, como para as reações de imunofluorescência<sup>6</sup>. Os vermes, colhidos por perfusão porta de camundongos infectados, eram lavados em solução salina (NaCl 0,15M) e em água destilada e secos em vácuo a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Trituravam-se em geral, a frio, as partículas resultantes sendo então suspensas em solução salina com formol a 1,5% e assim mantidas por 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação, tais fragmentos eram lavados e ressuspensos em PBS. Para a fixação das partículas sobre lâminas de microscopia, depositavam-se gotas da suspensão sobre pequenas áreas (0,5 cm) quadriculadas em sua superfície com esmalte de unhas. Secavam-se as lâminas por alguns minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e guardavam-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

*Conjugado enzimático* — Marcaram-se com peroxidase (horse-radish peroxidase, tipo II, Sigma Chemical Co., USA) anticorpos de carneiro antiglobulinas humanas, pela técnica de AVRAMEAS<sup>1</sup>. Esta consistiu fundamentalmente em se misturar soluções respectivamente com 20 mg de globulinas e 20 mg de peroxidase e se adicionar lentamente solução de aldeído glutárico a 1%. Após se manter a mistura por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação, removeu-se a enzima livre por precipitação das globulinas com sulfato de amônio na concentração final de 1,56M. O precipitado, lavado duas vezes com solução de sulfato de amônio nessa concentração e dissolvido em PBS, foi dializado a frio por 24 horas, com várias trocas desta última solução. Distribuído em alíquotas, o conjugado foi conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para uso, diluía-se em PBS segundo o título.

Para a caracterização do conjugado, determinou-se a intensidade de marcação pela relação enzima/proteína, obtida através das dosagens de ambos os elementos. A dosagem

de peroxidase foi feita por imunedifusão radial contra soros anti-peroxidase preparado em coelhos, como descrito por FERREIRA & col.<sup>8</sup> e a de proteínas pela técnica do biureto<sup>13</sup>, contra padrão de globulinas humanas determinado pelo método de Kjeldahl. Segundo a relação encontrada de 0,2 mg de peroxidase por miligrama de proteínas, o conjugado apresentava cerca de 1 molécula de enzima por molécula de globulina.

Determinou-se igualmente a atividade imune do conjugado, por precipitação em gel de ágar contra globulinas humanas, como descrito para conjugados fluorescentes<sup>5</sup>, encontrando-se 64 unidades antiglobulínicas por mililitro.

*Reação* — Distribuíam-se gotas de diluições dos soros sobre áreas das lâminas de microscopia com partículas de *S. mansoni* e incubavam-se a  $37^{\circ}\text{C}$ , em câmara úmida por 30 minutos. Após duas lavagens de 10 minutos em PBS, enxugavam-se as lâminas cuidadosamente em papel absorvente e adicionava-se às áreas de reação uma gota de conjugado, diluído segundo o título. Após nova incubação por 30 minutos e lavagens, procedia-se à reação reveladora da ação catalítica da enzima. Seguiu-se a técnica descrita por GRAHAN & KARNOVSKI<sup>10</sup>, recobrimdo-se as lâminas, à temperatura ambiente por 15 minutos, com solução de 5 mg de diaminobenzidina tetrahidroclorada em 10 ml de solução de tampão Tris HCl 0,05M pH 7,6, adicionada no momento do uso de 0,01% de peróxido de hidrogênio. As lâminas eram lavadas, montadas com DPX-Mountant (B.D.H. Chem. Ltd., England) e lamínula, e examinadas ao microscópio com objetiva de 20x ou de 40x.

#### C — Reações de imunofluorescência e de hemaglutinação

Para a reação de imunofluorescência, seguiu-se a técnica descrita por CAMARGO & col.<sup>6</sup>, com fragmentos de vermes adultos, como para a técnica imunoenzimática. Para a reação de hemaglutinação seguiu-se a técnica de HOSHINO & col.<sup>12</sup>, sensibilizando-se as hemácias com extratos de vermes frescos. Uma vez sensibilizadas, as hemácias eram preservadas por liofilização e, quando recons-

QUADRO I

Titulação do conjugado enzimático na reação para anticorpos anti-*S. mansoni*

Diluições dos conjugados 1:	Diluição do soro positivo a 1:						Diluições do soro negativo a 1:		
	10	20	40	80	160	320	10	20	40
5	4	4	4	3	2	1	0	0	0
10	4	4	4	3	2	1	0	0	0
20	4	4	3	2	2	±	0	0	0
40	4	2	2	1	1	0	0	0	0
80	3	2	2	±	0	0	0	0	0
160	2	2	1	0	0	0	0	0	0

(1) a (4): reações positivas  
 (0) : reações negativas  
 (±): reações duvidosas

tituídas com água destilada e conservadas a 4°C, podiam ser utilizadas por um período mínimo de 3 semanas.

RESULTADOS

Titulação do conjugado enzimático

Procederam-se a reações de imunoperoxidase com diluições crescentes, a partir de 1:10, de um soro reagente e de um soro não reagente, e de conjugado enzimático. Determinaram-se desse modo, as diluições do conjugado capazes de fornecer reatividade máxima e tomou-se 1:10 como diluição de uso, duas vezes mais concentrada que a diluição limiar (Quadro I).

As partículas apresentavam-se apenas visíveis, com discreta coloração amarelada para as reações negativas, enquanto de cor marrom escura para as reações positivas (Fig. 1), de intensidades variáveis avaliadas de 1 a 4.

Reações com soros de pessoas infectadas e não infectadas pelo *S. mansoni*

Nos 25 soros de pacientes parasitados pelo *S. mansoni* encontraram-se reações positivas, de títulos de 1:40 a 1:640 (Quadro II) que em geral coincidiam com os títulos fluores-

centes, dentro da variação de 1 diluição. Quando não idênticos (10 soros), os títulos enzimáticos foram mais elevados que os títulos fluorescentes, com uma única exceção. Com relação à reação de hemaglutinação, os títulos da reação enzimática coincidiram em



Fig. 1 — Reação de imunoperoxidase para a esquistossomose (Objetiva 40 x)

FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E. & NAKAHARA, O.S. — Pesquisa de anticorpos anti-*Schistosoma mansoni* pela técnica anti-globulínica de imunoperoxidase. Comparação com as reações de imunofluorescência e de hemaglutinação. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 16:341-345, 1974.

QUADRO II

Comparação de títulos das reações de imunoperoxidase, imunofluorescência e hemaglutinação, para a esquistossomose, em 25 soros de pessoas parasitadas pelo *S. mansoni*

Soros n.º	Reações de		
	Imunoperoxidase	Imunofluorescência	Hemaglutinação
2560	80	40	640
2708	160	80	320
2710	80	40	160
2711	80	80	160
2712	160	40	160
2713	40	20	40
2717	640	160	320
2718	640	80	640
2729	160	80	2560
2733	160	160	320
2736	80	40	80
2742	80	40	320
2745	80	80	320
2750	160	80	80
2755	40	40	160
2761	80	80	640
2771	80	80	320
2773	80	80	320
2779	160	160	640
2780	160	80	2560
2786	40	80	640
2787	160	80	1280
2970	40	40	640
3012	160	40	80
3045	40	40	320

11 casos, dentro da variação de uma diluição, as divergências devendo-se a valores hemaglutinantes geralmente mais elevados.

Nos soros de 20 não-portadores de esquistossomose, as reações foram negativas. Estes incluíam duas pessoas normais (check-up clínico e laboratorial) e pacientes apresentando altos níveis de anticorpos para os agentes etiológicos das afecções de que eram portadores, ou de auto-anticorpos. Havia quatro pacientes de doença de Chagas, 2 de malária, 2 de toxoplasmose aguda, 2 de leishmaniose cutâneo-mucosa, 2 de sífilis, 2 de pêfígo foliáceo, 2 de mononucleose infecciosa e 2 de lupus eritematoso sistêmico.

DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos, também na reação indireta para anticorpos anti-*S. mansoni* a marcação de anticorpos globulínicos com peroxidase parece substituir satisfatoriamente a marcação fluorescente, obtendo-se preparados mais estáveis e que podem ser observados em microscopia de iluminação comum. A sensibilidade da reação não é menor que a do teste fluorescente e não há indícios de que possa ser menos específica. De fácil execução, a técnica imunoenzimática poderá representar um teste útil para diagnóstico e estudo sorológico da esquistossomose.

#### SUMMARY

*Detection of anti-Schistosoma mansoni antibodies through an immuno-peroxydase-antiglobulin technique, as compared to the standard immunofluorescence and hemagglutination reactions.*

A peroxydase-antiglobulin test is described for the serology of schistosomiasis, using as antigen fragments of worms fixed on microscope slides. Preparation and characterization of the enzymatic conjugate are referred, as well as the determination of the dilution to be used in the test so as to insure a maximal reactivity. Results in 25 serum samples from patients infected with *S. mansoni* were positive, with titers ranging from 1:40 to 1:640 and similar or slightly higher than fluorescent titers. Negative tests were seen in sera from 20 people including normals and patients with different diseases and presenting high titers of antibodies to the respective ethiological agents, or auto-antibodies. The enzymatic test seems thus practical for routine purposes.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVRAMEAS, S. — Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde. *Immunochemistry* 6:43-52, 1969.
2. AVRAMEAS, S. — Immune enzyme technique: enzyme as markers for the localization of antigens and antibodies. *Int. Rev. Cytol.* 27:349-352, 1970.
3. AVRAMEAS, S. & URIEL, J. — Methode de marquage d'antigenes et d'anticorps avec des enzymes et son application et immunodiffusion. *C.R. Ac. Sci. (Paris)* 262:2543, 1966.
4. BENSON, M.D. & COHEN, A.S. — Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. Detection with horseradish peroxidase conjugated antibodies. *Ann. Inter. Med.* 73:943-949, 1970.
5. BEUTNER, E.H.; SEPUVELDA, M.R. & BARNETT, E.U. — Quantitative studies of immunofluorescent staining. Relationship of the characteristics of unabsorbed antihuman IgG non specific staining properties in an indirect test for antinuclear factors. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39:587-606, 1968.
6. CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. & SILVA, L.C. — A slide fluorescent antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnosis of schistosomiasis *Mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:327-331, 1965.
7. DORLING, J.; JOHNSON, G.D.; WEEB, J. A. & SMITH, M.E. — Use of peroxidase conjugated antiglobulin as an alternative to immunofluorescence for the detection of antinuclear factor serum. *J. Clin. Path.* 24: 501-503, 1971.
8. FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E. & NAKAHARA, O.S. — Determinação de peroxidase nos conjugados imunoenzimáticos pela técnica de imunodifusão radial (In press).
9. FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E. & NAKAHARA, O.S. — Immunoperoxidase antibody test for the serologic diagnosis of American Trypanosomiasis. *Exp. Parasit.* (In press).
10. GRAHAN JR., R.C. & KARNOVSKY, M.J. — The early stages absorption of injected horseradish peroxidase into the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14:291-302, 1966.
11. HOLMGREEN, J. & VENNERHOEM, S. — Enzyme linked immunosorbent assays for cholera serology. *Infect. Immunity* 7:759-763, 1973.
12. HOSHINO, S.; CAMARGO, M.E. & SILVA, L.C. — Standardization of a hemagglutination test for schistosomiasis with formalin-treated human erythrocytes. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 19:463-470, 1970.
13. KABAT, E.A. & MEYER, M.M. — *Experimental Immunochimistry*. Springfield, Charles C. Thomas, 1961.
14. NAKANE, P.K. & PIERCE, G.B. — Enzyme-labelled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14:929-931, 1966.
15. PETRAMANIS, I.; MARKETAKIS, J.; KAKLAMANIS, E.; TZAMOURANIS, N. & PAULATOS, M. — The application of the immunoenzyme method in microbiology. Detection of anti-*Treponema* and anti-*Toxoplasma* antibodies. *J. Immunol. Meth.* 2:251-260, 1973.
16. PETTS, V. & ROITT, I.M. — Peroxydase conjugates for demonstration of tissue antibodies: evaluation of the technique. *Chm. Exp. Immunol.* 9:407-418, 1971.
17. WICKER, R. — Comparison of immunofluorescent and immunoenzymatic techniques applied to the study of viral antigens. *Ann. N.Y. Ac. Sci.* 177:490-500, 1971.

Recebido para publicação em 13/3/1974.