

PREPARO DO ANTÍGENO PARA INTRADERMO-REAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE

JOSÉ M. RUIZ

(Secção de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

No estudo do problema tão atual da esquistossomose há muitos aspectos a abordar. Nenhum deles foi até a presente data resolvido plena e satisfatoriamente. Sem dúvida dos mais importantes é o que se refere ao diagnóstico. Podemos afirmar que na esquistossomose, método algum de diagnóstico permite uma segurança de 100%, não por culpa do método em si, mas por fatores outros independentes do próprio método diagnóstico.

A intradermo-reação constitui atualmente o método biológico mais seguro e prático para o diagnóstico de esquistossomose. Como tôdas as reações biológicas está sujeita, é claro, à variação da sensibilidade individual o que lhe diminui em parte o valor. Mesmo assim, dentro das reações cutâneas é uma das mais sensíveis e específicas.

O preparo de bons antígenos para essa prova será sem dúvida o primeiro passo do qual dependerão os resultados.

As discordâncias observadas entre diversos autores na interpretação das reações intradérmicas, devem ser antes atribuídas à diversidade das condições de trabalho e do antígeno empregado do que à excelência do método.

Três tipos de antígenos foram empregados em tais provas: de hepatopâncreas de moluscos infestados, cercárias de *Schistosoma* e *Schistosoma* adultos. Não nos referimos aqui aos antígenos heterólogos que não conseguiram se introduzir na prática.

O antígeno preparado a partir de hepatopâncreas de moluscos infestados com cercárias de *Schistosoma*, foi introduzido por Fairley e Willians (4), primeiros autores a praticar a intradermo-reação no diagnóstico da esquistossomose. A partir de então, numerosos pesquisadores têm publicado trabalhos valiosos

sobre o assunto, tendo sido estudados isolada ou comparadamente antígenos de vermes adultos e de cercárias. Desde logo se verificou que o antígeno de hepatopâncreas não se mostra tão eficaz quanto os demais.

O antígeno de vermes adultos é o mais usado. Com resultados práticos comparáveis ao de cercárias, é de obtenção mais fácil e mais segura, embora dependa da inoculação prévia de animais de laboratório. Esse trabalho entretanto é compensado pela segurança da identificação específica, pelo maior rendimento e pela pureza do antígeno obtido.

A técnica mais generalizada para a obtenção do antígeno é, em linhas gerais, a seguinte:

Obter vermes adultos de animais infestados há cerca de dois meses. Coletar os vermes em solução fisiológica, lavá-los diversas vezes com novas porções dessa solução e por fim com água destilada. Esgotar a água e colocar o material no refrigerador. Dessecar o material no vácuo, em presença de ácido sulfúrico ou carbonato de cálcio. Pulverizar os vermes secos. Submeter o pó a uma extração aquosa, usando como líquido extrator uma solução de Coca mertiolatada a 1:5.000 ou 1:10.000 ou fenolada a 0,4%. A extração é feita no refrigerador, durante 2 ou 3 dias ou mais, agitando-se o líquido diariamente. Após centrifugação e filtração obtém-se uma solução estoque que será diluída convenientemente para uso.

Há três pontos essenciais na consecução do antígeno, que ainda não estão perfeitamente padronizados: 1) obtenção de um antígeno purificado; 2) condições da extração relativas ao tempo e à temperatura e 3) proporção de líquido a empregar para a extração total.

Foge à finalidade da presente nota a discussão desses vários pontos em seus pormenores.

A proporção de líquido usado na extração é um ponto que diverge com os autores. Oliver Gonzalez e Pratt (7), Coutinho (2) e outros fazem a extração na proporção de 1,0 g de pó para 100 ml de líquido. Meyer e Pifano (5,6), Vianna Martins (9) fazem uma extração arbitrária, isto é, na proporção de mais ou menos 100 vermes, de ambos os sexos, por ml de líquido.

Seria de desejar a padronização desse detalhe técnico para avaliar comparativamente o valor dos antígenos. A pesagem de grande número de vermes não oferece a menor dificuldade. Pequenas amostras de pó constituem sem dúvida um problema, pois nem sempre os laboratórios de parasitologia são aparelhados com balanças de alta precisão. Pensamos resolver esse obstáculo, determinando o peso médio de um *Schistosoma* e estabelecendo uma fórmula que indique a quantidade de líquido a ser usada. Obter-se-á assim um antígeno estoque sempre na mesma proporção. É evidente que existirá uma

causa de erro inversamente proporcional ao número de vermes. Esse erro entretanto é desprezível e talvez menor que o das pesagens isoladas.

Parece existir ligeira variação de talhe nos *Schistosoma mansoni* de acordo com o animal utilizado na experimentação. Esse pormenor está sendo estudado atualmente em nosso laboratório.

O animal que melhor se presta para a finalidade em apreço é, a nosso ver, a cobaia. Os *Schistosoma* de desenvolvimento normal obtidos nesse animal têm, depois de perfeitamente secos, o seguinte peso médio: machos 0,000082 g ou 82 mcg., fêmeas 0,000023 g ou 23 mcg. Para obter uma sol. estoque a 1% poder-se-á aplicar a seguinte fórmula:

$$\frac{82 M + 23 F}{10,000} = N$$

sendo N a quantidade de líquido em ml a utilizar, 82 e 23 os pesos médios em mcg dos exemplares adultos machos M , e fêmeas F , respectivamente. Em nossa rotina achamos mais interessante fazer a extração a 1:200. Neste caso divide-se o denominador da fórmula por dois.

Nova técnica para a obtenção do antígeno.

Baseados nos princípios: 1) que a substância responsável pelas reações atópicas está contida na fração polissacaríde; 2) que o álcool absoluto e o éter sulfúrico não dissolvem e não alteram a referida substância e que 3) extraem ou eliminam as frações lipóide e protéica nas condições expostas a seguir, idealizamos uma nova técnica para a obtenção do antígeno para intradermo-reação na esquistossomose que apresentasse um alto grau de pureza sendo ao mesmo tempo de fácil consecução. Como os resultados fossem bons passamos a divulgá-la.

A 20 de janeiro do presente ano foi apresentada e discutida na reunião mensal da Sociedade de Biologia de São Paulo.

Os antígenos para intradermo-reação como são preparados atualmente constituem um extrato aquoso total com certa quantidade de proteínas e de lipóides, ou um complexo lipóide de constituição coloidal. Tratando previamente o material a ser extraído pelo álcool absoluto e éter sulfúrico, proteínas e lipóides são eliminados de maneira mais ou menos completa. Obtem-se assim um antígeno grandemente purificado.

A seguinte técnica nos forneceu ótimos resultados:

- 1 — Recolher os vermes adultos obtidos por infestação experimental de cobaias, por meio de perfusão do fígado e mesentério.

- 2 — Coletar os vermes em solução fisiológica numa pequena placa de Petri.
- 3 — Passar os vermes para um Becker de 20 a 30 ml de capacidade, contendo 15 a 20 ml de uma mistura de álcool absoluto e éter sulfúrico em partes iguais. Contar ao mesmo tempo o número de vermes de ambos os sexos. Usar álcool e éter de boa qualidade. Deixar o material coberto à temperatura ambiente.
- 4 — Após 4 a 24 horas, esgotar o álcool-éter, emborcando cuidadosamente o frasco que deve permanecer, cerca de um minuto, invertido sobre um papel de filtro (Esse líquido evaporado deixa um pequeno resíduo que dá forte reação pelo ácido ósmico manifestada por um enegrecimento acentuado).
- 5 — Dessecar os vermes no vácuo durante meia hora. Os vermes ficam soltos, muito alvos e a secagem é muito rápida.
- 6 — Transferir os vermes para um tubo de centrifugação estéril e triturar com um fino bastão de vidro, reduzindo-os a pó bem fino. Nesta operação é preciso cautela porque os vermes ressecados se projetam à longa distância sob a pressão do bastão.
- 7 — Juntar ao pó 10 a 15 ml de álcool-éter, agitar bem e deixar em contacto uma ou duas horas.
- 8 — Esgotar o álcool-éter e dessecar o pó novamente no vácuo, durante 10 a 15 minutos (O resíduo deixado pela evaporação desta nova porção de álcool-éter dá ainda reação positiva para lipóides).
- 9 — Juntar ao pó a quantidade de líquido extrator indicado pela fórmula:

$$\frac{82 \text{ M} + 23 \text{ F}}{5.000} = \text{N}$$

Usar como líquido extrator solução de Coca mertiolatada a 1:5.000 ou 1:10.000. Deixar em contacto dois ou três dias à temperatura ambiente ou oito dias no refrigerador.

- 10 — Centrifugar em alta rotação durante 20 minutos. O líquido sobrenadante, límpido e incolor, constitui a solução estoque que deve ser ampolada ou guardada em flaconetes estéreis. Este extrato mostra-se estéril, não revela traços de proteínas (pelo ácido fosfo-molibdico, ácido fosfotúngstico ou pela reação do biureto, nem de lipóides, pelo ácido ósmico, sendo a reação de Molish nitidamente positiva).

Não experimentamos a extração rápida a quente (56°C) preconizada por Meyer e Pifano (6) e Coutinho (3).

Inicialmente preparamos o antígeno por técnica semelhante à de Meyer e Pifano (5) e Coutinho (1). A titulação foi feita, segundo as indicações de Vianna Martins (9), em indivíduos, eliminando ovos de *S.mansoni*. Obtivemos um título, com muita margem de segurança, de 1:8.000. Aliás, esse título é um número arbitrário porque consideramos a solução estoque como sendo a 1% e pelo processo usado os vermes não são pesados mas contados indistintamente e a extração é feita na proporção de 100 vermes para cada ml de líquido extrator. Demos a esse antígeno o prefixo *Pl*, para nosso controle.

Fizemos um lote de antígeno pela técnica que acabamos de descrever, utilizando porém um número de vermes correspondente ao utilizado em *Pl*. Esse antígeno foi designado *P5* e usado na mesma diluição de 1:8.000.

Pl foi testado inicialmente em 19 casos (tabela I).

Pl e *P5* foram testados comparativamente em 89 casos (tabela II).

P5 foi testado isoladamente em 44 casos (tabela III).

Todas as provas foram controladas, usando-se como testemunha o líquido de Coca mertiolatado. A leitura das reações obedeceu ao seguinte critério:

Reação negativa (—). Pápula igual ou ligeiramente maior que a formada pelo líquido testemunha, ou pápula inicial.

Reação duvidosa (\pm). Pápula com menos do dobro da do testemunha, de bordos lisos ou regulares. Pápula maior de bordos indecisos.

Reação positiva fraca (+). Pápula com o dobro da do testemunha, um tanto irregular ou um pouco maior, de bordos lisos.

Reação positiva média (++) . Pápula com cerca de 3 vezes o diâmetro da do testemunha de bordos um tanto irregulares ou o dobro da do testemunha e pseudópodos nítidos.

Reação positiva forte (+++) . Pápula com mais de 3 vezes o diâmetro da do testemunha ou um pouco menor porém com pseudópodos muito longos.

TABELA I

Casos testados com antígeno Pl.

	Comprovadamente positivos	Suspeitos de zonas endêmicas	Não suspeitos Ex. fezes neg.
Número de casos	5	7	7
Positivos	5	2	4
Negativos	0	5	6

TABELA II

Casos testados comparadamente com os antígenos P1 e P5.

	Comprovadamente positivos	Suspeitos com Ex de fezes neg.	Não suspeitos Ex. de fezes neg.
Número de casos . . .	11	67	11
Positivos			
P1	10	14	0
Positivos			
P5	11	18	0
Negativos			
P1	0	45	11
Negativos			
P5	0	45	11
Duvidosos			
P1	1	8	0
Duvidosos			
P5	0	4	0

Em 8 casos houve pequena discordância entre duvidoso e fracamente positivo. Em 7 casos positivos as reações foram mais nítidas com P5 e em um caso com P1. A concordância, praticamente, foi de 100%, ambos com especificidade e sensibilidade 100%.

TABELA III

Casos testados com antígeno P5, em pessoal residente na cidade de Caratinga, Minas Gerais, zona de alta endêmicidade

	Sem indicação	Sabidamente positivos	Tratados, sem exames de fezes após o tratamento	Com exame de fezes negativo	Suspeitos Sem exame de fezes
Números de casos	8	10	4	21	1
Positivos	8	9	1	8	1
Negativos	5	1	3	13	0

Houve uma discordância entre os comprovadamente positivos.

Os casos com exame de fezes negativos não são excluídos com segurança numa zona de alta endemicidade. Sete dos oito indivíduos com reações positivas fizeram um único exame de fezes e um fez dois exames negativos.

Num dos casos não suspeitos da *Tabela I* cuja reação era positiva (++) foi feita nova reação, cerca de dois meses depois, com antígeno obtido pelo processo exposto (antígeno P8-15); o resultado foi negativo.

Em conclusão verifica-se que o antígeno preparado pela técnica proposta não é inferior ao obtido pelo processo de Meyer e Pifano (5), tendo mesmo uma ligeira superioridade devido talvez à maior pureza do extrato.

Recentemente Coutinho (3), em trabalho que nos chegou às mãos depois de elaborado o nosso, apresentou uma nova técnica de preparo do antígeno de vermes adultos. Consta, sumariamente, em tratar os vermes por repetidas porções de acetona, secagem no ambiente de laboratório ou na estufa a 37°C e extração aquosa em geladeira ou em banho-maria a 56°C, conforme técnica de Meyer e Pifano (6). O autor ressalta a maior sensibilidade das reações com esse novo antígeno.

RESUMO

É apresentada uma nova técnica ao preparo do antígeno para intradermo-reação na esquistossomose. Consiste em tratar os vermes adultos, obtidos de cobaias, por uma mistura, em partes iguais, de álcool absoluto e éter sulfúrico p. a., dessecamento no vácuo, trituração dos vermes secos e lavagem do pó com outra porção de álcool-éter; nova secagem no vácuo e extração pelo líquido de Coca mertiolatado. A extração é feita na proporção de 1:200. A quantidade de líquido extrator a ser usada em cada amostra de pó é dada pela fórmula:

$$\frac{82 M + 23 F}{5.000} = N$$

donde 82 e 23 representam os pesos médios, em *mcg* dos exemplares adultos machos e fêmeas, (M) e (F), respectivamente.

O antígeno foi testado comparativamente com outro preparado, segundo a técnica de Meyer e Pifano (5), em 89 casos (11 comprovadamente positivos, 67 de indivíduos de zonas suspeitas e 11 sabidamente negativos). Os resultados concordam em, praticamente, 100% dos casos, porém o novo antígeno se mostrou ligeiramente mais sensível e específico.

O método proposto é de mais fácil consecução, sendo o antígeno obtido em grande grau de pureza, sem traços de proteínas e lipóides e com reação de Molisch (polisacárides) positiva. O resíduo obtido pela evaporação dos líquidos de lavagem (álcool-éter), reage fortemente com o ácido ósmico, revelando sua natureza lipóidica.

SUMMARY

A new technique for antigen preparation to schistosomiasis intradermal diagnosis is presented. It consists in: I) — Treat the adult worms (obtained from guinea-pigs) with a mixture of alcohol and ether in equal amounts, before dissecting in vacuum. II) — Triture the dried worms and wash the power with another amount of alcohol-ether. III) — Vacuum again and extract with the Coca merthiolated liquid. The extraction is made in the proportion of 1:200. The quantity of extractor liquid to be used, with each amount of power, is given by the formula:

$$\frac{82 M + 23 F}{5.000} = N$$

N is the quantity (ml) of extractor liquid to be used. 82 and 23 are the medium weight (mcg) of the adult worms, males (M) and females (F) respectively.

The antigen was tested comparatively with another one prepared according to the Meyer and Pifano's method (5) in 89 cases (11 surely positives, 67 from suspected zones individuals and 11 surely negatives). The results agree in 100% the cases but the new antigen has shown to be slightly more sensible and specific.

The antigen by the proposed method is more easely prepared being obtained in a high degree of purity without traces of proteins and lipoids and presenting Molisch reaction (polysaccharides) positive.

The residual obtained by the evaporation of the alcool-ether mixture reacts strongly with the osmic acid showing its lipoidic nature.

BIBLIOGRAPHY

1. Coutinho, J. O. — Nota sobre a intradermo-reação no diagnóstico da esquistossomose de Manson. *Rev. Paul. Med.*, 33: 15-20, 1948.
2. Coutinho, J. O. — Contribuição ao estudo da esquistossomose mansônica no Estado da Bahia, Brasil. *Arq. Hig. Saude Publica*, 16: 1-42, 1951.
3. Coutinho, J. O. — Nova técnica de preparo de antígeno de vermes adultos para a intradermo-reação na esquistossomose. *Folia Clin. Biol.* 18: 121-124, 1952.
4. Fairley, N. H. & Willians, F. E. — A preliminary report on an intradermal reaction in Schistosomiasis. *Med. J. Australia*, 14: 811-818, 1927.
5. Meyer, M. & Pifano, F. — El diagnostico de la Schistosomiasis por la Intradermoreacción con un antígeno preparado de vermes adultos de *S. mansoni*. *Rev. Sanid. Assist. Social*, 10: 3-44, 1945.

6. Meyer, M. & Pifano, F. — Experiencias de ocho años en la elaboracion y aplicacion de um antígeno de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* para la intradermo-reaccion diagnostica de la Bilharziasis. *Arch. Venez. Patol. Trop. Paras. Med.*, 1: 1-35, 1949.
7. Oliver-Gonzalez, J. & Pratt, C. K. — Skin and precipitin reaction to antigens from cercariae and adult of *Schistosoma mansoni*. *Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med.*, 2: 242-248, 1945.
8. Taliaferro, W. H. & Taliaferro, L. G. — Skin reaction in persons infected with *Schistosoma mansoni*. *Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med.*, 7: 23-35, 1931.
9. Vianna Martins, A. — Diagnóstico de Laboratório de Esquistossomose Mansoni. *Tese de concurso para Prof. Catedrático. Faculd. Méd. Univ. Minas Gerais. Imprensa Oficial*, 265 pp. 1949.

