

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

I. Estudo comparativo entre as reações de floculação, de imunofluorescência e de fixação do complemento

J. PELLEGRINO

RESUMO

Os resultados das reações, praticadas no sôro de 307 pacientes com esquistossomose mansônica, foram:

Reação de fixação do complemento: 96,1% positivos, 1 duvidoso (0,3%) e 3,6% negativos.

Reação de floculação: 92,2% positivos, 2,9% duvidosos e 4,9% negativos.

Reação de imunofluorescência: 85,7% positivos, 5,2% duvidosos e 9,1% negativos.

No grupo controle, a reação de fixação do complemento foi negativa em todos os casos. As reações de floculação e de imunofluorescência deram 5% de resultados positivos e 4% de duvidosos.

A reação de fixação do complemento mostrou ser o teste sorológico mais sensível e específico para o diagnóstico da esquistossomose mansônica, podendo ser indicada como o método de escolha na orientação diagnóstica de casos individuais. Em levantamentos epidemiológicos, as vantagens de cada prova sorológica foram analisadas e discutidas.

INTRODUÇÃO

As falhas e as desvantagens dos processos de demonstração parasitológica da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, têm estimulado, especialmente nos últimos anos, o desenvolvimento de novos métodos imunológicos de diagnóstico e o aperfeiçoamento dos já existentes (cf. revisão feita por KAGAN & PELLEGRINO⁶). A necessidade de se recorrer aos métodos imunológicos se faz sentir, não só quando o clínico precisa do auxílio do laboratório para esclarecer um diagnóstico sugerido pela anamnese e exame do doente, mas, principalmente, quando o sanitarista

pretende determinar a prevalência da esquistossomose em certa localidade ou região.

Com a principal finalidade de proporcionar um meio simples, eficiente e econômico para levantamentos epidemiológicos, foram recentemente descritas duas novas reações para o diagnóstico imunológico da esquistossomose: a *reação de floculação*, na qual um antígeno preparado a partir de cercárias de *S. mansoni* é adsorvido a cristais de lecitina-colesterol (ANDERSON¹) e a *reação de imunofluorescência* com cercárias de *S. man-*

Instituto Nacional de Endemias Rurais e Instituto de Biologia, Faculdade de Filosofia da Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Trabalho realizado com auxílio financeiro da Organização Mundial da Saúde (Division of Communicable Diseases, Parasitic Diseases Section, World Health Organization).

soni tratadas com albumina bovina conjugada com rodamina e fixadas em formol (SADUN, WILLIAMS & ANDERSON¹¹; ANDERSON, SADUN & WILLIAMS³).

Neste trabalho serão apresentados os resultados obtidos com as reações de floculação, de imunofluorescência e de fixação do complemento praticadas em pacientes com esquistossomose mansônica e em indivíduos seguramente não infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes com esquistossomose e controles

— As reações imunológicas foram feitas com o soro de 307 pacientes com esquistossomose, sendo que 199 viviam em Medina, norte do Estado de Minas Gerais, em zona de alta endemicidade, e 108 eram militares da Base Aérea de Lagoa Santa, cidade situada a 37 km de Belo Horizonte. Em todos os casos foram encontrados ovos de *S. mansoni* nas fezes. Como controle, as reações foram feitas com o soro de 100 indivíduos, aparentemente saudáveis, que sempre moraram em Florianópolis ou arredores (Estado de Santa Catarina), onde a esquistossomose não é encontrada. A não ser os militares, os moradores de Medina e Florianópolis incluíam indivíduos de ambos os sexos e de diversos grupos etários. Os soros foram conservados a -20°C e, antes de serem feitas as reações, eram inativados a 56°C , durante 30 minutos.

Reação de floculação — Para o preparo do antígeno, cercárias de *S. mansoni* foram obtidas de *Australorbis glabratus* naturalmente infectados. Os caramujos foram expostos à luz artificial por cerca de 2 horas e as cercárias eliminadas foram concentradas em funis de Büchner munidos de placa de vidro sinterizado com porosidade média e depois sedimentadas a 6°C de um dia para outro (PELLEGRINO & NUNES⁹). O sobrenadante foi aspirado e o depósito contendo as cercárias, altamente concentradas, foi transferido para ampolas de 5 ml. Após rápida sedimentação a 6°C , a maior parte do líquido sobrenadante foi aspirado com trompa de vácuo. Cada ampola foi submetida a forte rotação em torno de seu eixo longitudinal e ao mesmo tempo submersa em mistura de

gêlo seco e álcool. O material congelado foi liofilizado, as ampolas fechadas sob vácuo e depois conservadas a -20°C .

A extração do material antigênico e o preparo da emulsão para a prova de floculação foram feitos de acordo com a técnica descrita por ANDERSON¹. A reação foi praticada em lâminas de Boerner, sendo que em cada escavação foram colocados 0,05 ml de soro inativado. Uma gota da emulsão lecitina-colesterol-antígeno (cerca de 1/80 ml) foi deixada cair em cada soro. As lâminas foram então colocadas em rotador a 180 rpm durante 4 minutos. A leitura foi feita logo depois em microscópio de dissecação e os resultados anotados como negativo (—), duvidoso (\pm) e positivo (+, ++, +++).

Reação de imunofluorescência — Cercárias recentemente eliminadas por *A. glabratus* naturalmente infectados foram concentradas de modo a obter 200 a 300 cercárias por ml. Ao líquido contendo as cercárias foi adicionado albumina bovina conjugada com lissamina-rodamina RB-200 (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland) na proporção de 1:200. Transcorridos 5 minutos, as cercárias assim tratadas foram fixadas com formol a 10%, pela adição de igual volume de formol a 20%, e conservadas na geladeira.

A reação de imunofluorescência (método indireto) foi feita de acordo com a técnica descrita por SADUN, WILLIAMS & ANDERSON¹¹, sendo que a centrifugação foi substituída pela sedimentação espontânea das cercárias por 6 minutos. A diluição ótima da anti- γ -globulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (Baltimore Biological Laboratory Inc., Baltimore, Maryland) foi determinada por titulação em bloco. Os soros foram sempre diluídos a 1:4, depois de inativados. Tanto a diluição dos soros como as lavagens foram feitas com solução salina tamponada (tampão fosfato) 0,01 M e pH 7,2. As preparações foram examinadas com equipamento Leitz (microscópio Dialux com lâmpada de vapor de mercúrio Philips CS 150), usando filtros adequados. De acordo com a fluorescência, os resultados foram interpretados como: negativo (cercárias com fluorescência avermelha-

QUADRO I

Reações de imunofluorescência, de floculação e de fixação do complemento em pacientes com esquistossomose (307) e em controles (100)

Grupos investigados (localidades)	Nº de casos	Reações sorológicas										
		Imunofluorescência			Floculação			Fixação do complemento				
		Positivo	Duvidoso	Negativo	Positivo	Duvidoso	Negativo	Positivo	Duvidoso	Negativo	Positivo	Negativo
Parasitológicamente comprovados:												
Medina	199	167	13	19	192	3	4	192	1	6	6	
Base Aérea de Lagoa Santa	108	96	3	9	91	6	11	103	—	5	5	
Total	307 (100%)	263 (85,7%)	16 (5,2%)	28 (9,1%)	283 (92,2%)	9 (2,9%)	15 (4,9%)	295 (96,1%)	1 (0,3%)	11 (3,6%)	11	
Área não endêmica:												
Florianópolis	100	5	4	91	5	4	91	—	—	100	100	

da), duvidoso (contorno amarelo-esverdeado indistinto, não envolvendo completamente a cercária) e positivo (cutícula da cercária com fluorescência amarelo-esverdeada nítida; + a +++ conforme a intensidade).

Reação de fixação do complemento — Foi feita com antígeno de esquistossomos adultos (CHAFFEE, BAUMAN & SHAPILO⁴) e de acordo com técnica e critério de interpretação descritos por PELLEGRINO & FREITAS⁷. Os resultados foram anotados como negativo, duvidoso ou positivo.

RESULTADOS

Os resultados acham-se resumidos no Quadro I. No grupo de indivíduos com esquistossomose, a reação de fixação do complemento foi o teste que apresentou maior sensibilidade (96,1% de resultados positivos). A reação de floculação e a reação de imuno-

fluorescência forneceram resultados semelhantes. As percentagens de resultados positivos para estes dois testes sorológicos foram, respectivamente, de 92,2 e 85,7%. É interessante notar que nos indivíduos sujeitos a reinfecções (soros de Medina) os resultados obtidos com as reações de fixação do complemento e de floculação foram aproximadamente os mesmos.

O Quadro II mostra que, nos 307 pacientes com esquistossomose, as três provas sorológicas (fixação do complemento, floculação e imunofluorescência) foram positivas em 243 casos (79,1%). Em 51 casos duas das reações sorológicas foram positivas e, em 10, apenas uma prova resultou positiva (3,2%). Em 3 indivíduos as três reações sorológicas foram negativas (1,0%). É interessante notar que dos 10 casos em que apenas uma prova sorológica foi positiva, a reação de fixação do complemento resultou positiva em 7 (Quadro II).

QUADRO II

Resultados de 3 testes sorológicos (imunofluorescência, floculação e fixação do complemento) praticados em 307 pacientes com esquistossomose mansônica

Reações sorológicas	Nº de casos	Resultados positivos		
		Imunofluorescência	Floculação	Fixação do complemento
Positivas nos 3 testes	243 (79,1%)	243	243	243
Positivas em 2 dos 3 testes	51 (16,7%)	19	38	45
Positiva em apenas 1 teste	10 (3,2%)	1	2	7
Negativas nos 3 testes	3 (1,0%)	—	—	—
Total	307 (100,0%)	263 (85,7%)	283 (92,2%)	295 (96,1%)

No grupo de indivíduos com esquistossomose, a reação de fixação do complemento, praticada isoladamente, revelou 96,1% dos casos (295 indivíduos). Praticada juntamente com a reação de floculação evidenciou a infecção em 303 casos (98,7%) e, simultaneamente com a reação de imunofluorescência, em 302 casos (98,4%).

Nos 100 indivíduos tomados como controle, a reação de fixação do complemento foi negativa em todos. Neste mesmo grupo, tanto a reação de floculação como a de imunofluorescência deram 5% de resultados positivos e 4% de resultados duvidosos (Quadro I). É interessante notar que não houve concordância entre a reação de floculação e a de imunofluorescência nos casos em que uma destas provas resultou positiva ou duvidosa. Assim, em apenas um caso a reação de imunofluorescência foi positiva e a de floculação duvidosa. Em todos os outros casos (16), o resultado positivo ou duvidoso em uma das provas foi sempre negativo na outra.

DISCUSSÃO

Os resultados por nós obtidos com a reação de floculação, em pacientes com esquistossomose, confirmam os achados de ANDERSON & NAIMARK². De fato, estes autores, em 519 casos de esquistossomose mansônica, obtiveram 91% de reações positivas, 7% de duvidosas e 2% de negativas. Os resultados referidos por SADUN, WILLIAMS & ANDERSON¹¹, em relação à prova de floculação foram sensivelmente inferiores aos nossos. As reações positivas e duvidosas por nós obtidas em soros de indivíduos sem infecção esquistossomótica foram confirmadas quando repetidas com uma partida de antígeno, preparada por ANDERSON, com cercárias de *S. mansoni* colhidas em Pôrto Rico. Refere ANDERSON¹ ao encontro de uma reação duvidosa em um grupo de 25 indivíduos parasitados por *Trichocephalus trichiura*. É interessante lembrar que os nossos controles, embora aparentemente saudáveis, poderiam estar parasitados por uma ou mais espécies de helmintos. Embora tenha sido demonstrada a ocorrência de reações cruzadas em indivíduos infectados com *Trichinella spiralis* (ANDERSON¹), a existência de tais reações,

em outras helmintoses, ainda necessita ser investigada.

Os resultados por nós obtidos, praticando a reação de imunofluorescência com soro de pacientes com esquistossomose, foram semelhantes aos relatados por SADUN, WILLIAMS & ANDERSON¹¹ (75% resultados positivos, 17% duvidosos e 8% negativos). Os referidos autores, praticando a reação de imunofluorescência no soro de 39 controles saudáveis obtiveram 3% de reações positivas, 8% duvidosas e 90% negativas, resultados esses que muito se aproximam dos nossos. Os soros de indivíduos aparentemente saudáveis e seguramente livres de infecção esquistossomótica, nos quais a reação de imunofluorescência resultou positiva ou duvidosa, foram por nós enviados ao Departamento de Zoologia Médica (Walter Reed Army Institute of Research), onde a prova foi repetida. A quase totalidade dos resultados pôde ser confirmada. Mais recentemente, SADUN, ANDERSON & WILLIAMS¹⁰ referem resultados altamente satisfatórios, tanto em relação à especificidade quanto à sensibilidade, quando a reação de imunofluorescência é praticada com sangue dessecado em papel de filtro. Esta técnica apresentaria grande vantagem nos casos em que a punção venosa fôsse difícil.

Não há dúvida que a reação de fixação do complemento, com antígeno de esquistossomos adultos, previamente tratados com éter anidro (CHAFFEE, BAUMAN & SHAPILO⁴) representa o método de diagnóstico sorológico da esquistossomose mais específico e sensível. Os nossos dados e aqueles obtidos por ANDERSON & NAIMARK² e JACHOWSKI & ANDERSON⁵ justificam plenamente esta afirmativa.

O valor relativo de cada uma das provas sorológicas incluídas no presente estudo — reações de floculação, de imunofluorescência e de fixação do complemento — deve ser encarado de modo diferente caso as reações vão ser utilizadas para o diagnóstico de casos individuais, ou para levantamentos epidemiológicos. Na primeira hipótese, o clínico necessita de um recurso laboratorial dotado de grande especificidade e sensibilidade. Para esta finalidade, a complexidade

técnica do método laboratorial não constitui fator limitante. Já quando o sanitarista deseja recorrer a um método sorológico para determinar a prevalência da esquistossomose, os fatores economia e simplicidade assumem grande importância. Em vista destas considerações, não resta dúvida que a reação de fixação do complemento representa o recurso laboratorial de escolha para o esclarecimento diagnóstico em casos individuais. Em levantamentos epidemiológicos, quando existem facilidades para a colheita de sangue por punção venosa e remessa do material para laboratório central bem equipado, a reação de fixação do complemento pode fornecer elementos de grande valia para o sanitarista. Nestes últimos anos tivemos a oportunidade de praticar, no Instituto Nacional de Endemias Rurais, a reação de fixação do complemento em 31.625 escolares de 10 a 15 anos de idade, de diferentes zonas do Estado de Minas Gerais. Considerando os dados de acordo com as informações existentes sobre a distribuição da esquistossomose no Estado, os resultados foram os seguintes: zona de alta endemicidade — 59,7% de reações positivas; zona de endemicidade média — 14,8% de reações positivas; zona não endêmica — 1,7% de reações positivas. A reação de fixação do complemento foi também praticada em 1.400 escolares residentes no Estado de Santa Catarina, onde a esquistossomose não é conhecida. Em apenas um caso a reação foi positiva (0,14%). Embora menos específica e de sensibilidade mais baixa, a reação de floculação, pela sua simplicidade e rapidez, poderá vir a substituir a reação de fixação do complemento, especialmente em levantamentos epidemiológicos extensos. Quando existem dificuldades para a punção venosa, o sangue poderá ser colhido na polpa digital e absorvido em papel de filtro. Neste caso, a reação de imunofluorescência, praticada segundo a técnica de SADUN, ANDERSON & WILLIAMS¹⁰, pode oferecer grande vantagem. Entretanto, o valor real das reações de floculação e de imunofluorescência em levantamentos epidemiológicos somente poderá ser definitivamente aferido depois de realizados inquéritos sorológicos em diferentes regiões. Este assunto está sendo investigado em nosso laboratório.

SUMMARY

Serologic diagnosis of schistosomiasis mansoni. I. Comparative study of complement fixation, cercarial flocculation and immunofluorescence tests.

The tests were performed in serum samples from 307 patients with active schistosomiasis mansoni and the results were as follows: *complement fixation test*: 96.1% positive, 0.3% doubtful and 3.6% negative; *flocculation test*: 92.2% positive, 2.9% doubtful and 4.9% negative; *immunofluorescence test*: 85.7% positive, 5.2% doubtful and 9.1% negative.

The complement fixation test was negative in all controls. Flocculation and immunofluorescence tests were positive in 5% and doubtful in 4% of the control sera.

Complement fixation proved to be the most sensitive and specific test for the diagnosis of schistosomiasis mansoni and must be considered as the method of choice for the diagnosis of individual cases. For epidemiological surveys, the reliability for each serological test was analyzed and discussed.

AGRADECIMENTOS

A colaboração dos técnicos Lourenço Chiari e Alberto Geraldo dos Santos foi decisiva na realização do presente estudo. Agradecemos aos Drs. Elvio Sadun e Robert Anderson, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, pelo preparo do antígeno para a reação de floculação e pela repetição de provas sorológicas em soros enviados ao Departamento de Zoologia Médica; ao Dr. N. Ansari, Organização Mundial da Saúde, pela cooperação e estímulo.

REFERÊNCIAS

1. ANDERSON, R. I. — Serologic diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections. I. Development of a cercarial antigen slide flocculation test. Am. J. trop. Med. & Hyg. 9:229-303, 1960.

PELLEGRINO, J. — Diagnóstico sorológico da esquistossomose mansônica. I. Estudo comparativo entre as reações de floculação, de imunofluorescência e de fixação do complemento. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 5:147-153, 1963.

2. ANDERSON, R. I. & NAIMARK, D. H. — Serologic diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections. II. Sensitivity of intradermal and serologic tests on individuals with an unequivocal diagnosis of schistosomiasis. Am. J. trop. Med. & Hyg. 9:600-603, 1960.
3. ANDERSON, R. I.; SADUN, E. H. & WILLIAMS, J. S. — Preserved cercariae in the fluorescent antibody (FA) test for schistosomiasis. Exper. Parasitol. 11:226-230, 1961.
4. CHAFFEE, E. F.; BAUMAN, P. M. & SHAPILO, J. J. — Diagnosis of schistosomiasis by complement fixation. Am. J. trop. Med. & Hyg. 3:905-913, 1954.
5. JACHOWSKI, L. A. & ANDERSON, R. I. — Evaluation of some laboratory procedures in diagnosing infections with *Schistosoma mansoni*. Bull. Wld. Hlth. Org. 25: 675-693, 1961.
6. KAGAN, I. G. & PELLEGRINO, J. — A critical review of immunological methods for the diagnosis of bilharziasis. Bull. Wld. Hlth. Org. 25:611-674, 1961.
7. PELLEGRINO, J. & FREITAS, J. L. P. — Quantitative complement fixation test in schistosomiasis mansoni. Am. J. trop. Med. & Hyg. 10:537-540, 1961.
8. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — A simplified method for the concentration of cercariae. J. Parasitol. 41:329-330, 1955.
9. PELLEGRINO, J. & NUNES, R. M. B. — Técnica de obtenção de cercárias desidratadas de *Schistosoma mansoni* para o preparo de antígenos. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. 8:397-404, 1956.
10. SADUN, E. H.; ANDERSON, R. I. & WILLIAMS, J. S. — Fluorescent antibody test for the laboratory diagnosis of schistosomiasis in humans by using dried blood smears on filter paper. Exper. Parasitol. 11: 117-120, 1961.
11. SADUN, E. H.; WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. — Fluorescent antibody technic for sero-diagnosis of schistosomiasis in humans. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. 105: 289-291, 1960.

Recebido para publicação em 18 março 1963.