

O DIAGNÓSTICO PELA IMUNO-FLUORESCÊNCIA. SUA APLICAÇÃO EM PARASITOLOGIA

J. Fraga de AZEVEDO e Palmira Coelho ROMBERT

RESUMO

A prova da imuno-fluorescência indireta aplicada ao diagnóstico da bilharziose, usando os soros a estudar inativados, como antígenos cercárias e ovos e como fluorocromo o isotiocianato de fluoresceína, mostrou-se de grande interesse. Com as cercárias de *S. mansoni* a taxa de positividade foi de 98% em 45 soros de doentes de bilharziose vesical, enquanto que utilizando cercárias de *S. haematobium* a positividade se verificou nos 4 soros do mesmo tipo de doença, número insuficiente para dizermos que será mais específica que outras provas. Com soros normais foram tôdas negativas.

Utilizando os ovos como antígeno a reação parece ser realmente específica da espécie, pois não se verificou em 6 casos de bilharziose vesical com ovos de *S. mansoni*, e foi positiva em 9 do mesmo tipo de doença com ovos de *S. haematobium*.

Os casos de bilharziose intestinal de Moçambique revelaram com os ovos de *S. mansoni* uma positividade de 88% e os do Brasil apenas 66,6%, o que talvez esteja relacionado com o fato destes últimos soros estarem já bastante contaminados.

Porém, com ovos de *S. haematobium* as reações foram tôdas negativas e o mesmo aconteceu nas efetuadas com soros normais com qualquer espécie de ovos.

Mais interessante é o fato de que em 2 casos com soros normais se notou reação peri-ovular embora só do grau +, mas as pequenas bolhas de precipitado não tomaram a fluorescência.

A prova da imuno-fluorescência aplicada ao diagnóstico do quisto hidático, utilizando escólices de quisto hidático de carneiro como antígeno, revelou-se positiva em 100% de 14 soros de carneiros parasitados e foi negativa em 23 casos, de 34 normais usados como testemunhas mas em 10 revelou-se duvidosa. Em seis casos humanos de quisto hidático foi positiva em 5 e negativa em um e em 20 soros de indivíduos sem esta parasitose foi duvidosa em sete e negativa nos restantes.

INTRODUÇÃO

Depois que em 1942 COONS, CREECH, JONES & BERLINER⁶ tiveram a idéia de fazer ligar uma substância fluorescente à globulina correspondente aos anticorpos e verificaram seguidamente que na ligação anti-

geno-anticorpo a fluorescência se mantinha e era posta facilmente em evidência ao microscópio, com iluminação ultra-violenta, surgiu uma nova era de grandes possibilidades na ciência, a era da imuno-fluorescência. E,

Instituto de Medicina Tropical de Lisboa, Portugal. Trabalho realizado com o auxílio da Divisão Científica da O.T.A.N. e apresentado à Secção de Ciências da Academia das Ciências de Lisboa, em 6 junho 1963.

realmente, a breve trecho, inúmeras aplicações²¹ foram feitas dêsse fenômeno no campo da microbiologia, parasitologia, hematologia e patologia.

Assim, na microbiologia tem sido notável a contribuição dada por êste nôvo método de investigação no diagnóstico rápido das doenças infecciosas, na caracterização dos germes e no estudo da sua estrutura.

Realmente, considerando os meios correntes de diagnóstico das infecções bacterianas, dizem justamente COONS *et al.* que são habitualmente necessárias 24 horas para se proceder à sua identificação. Recorrendo aos anticorpos fluorescentes, diz que “uma bactéria tornada fluorescente brilha como uma estrêla quando vista com um microscópio de grande aumento. Portanto, quando a bactéria reage com uma solução de anticorpo específico ela brilha e é identificada ao mesmo tempo”⁶.

Em princípio, portanto, compreende-se que um método tão preciso e tão rápido, permita a pesquisa e identificação imediata de todo o agente infeccioso qualquer que seja o lugar onde se encontre e assim é que se tem aplicado a esfregaços, cortes de tecidos, células, etc., segundo técnicas variadas.

Realmente, tem-se podido identificar rapidamente por êste método o estreptococo hemolítico na garganta, com o mesmo ou maior rigor que usando os métodos clássicos; tem-se podido identificar rapidamente o colibacilo patogênico nas fezes e seu significado nas gastrerenterites infantis; o bacilo pertussis foi identificado nas secreções da garganta, o *Haemophilus influenzae* no líquido céfalo-raquidiano, o gonococo nas secreções uretrais, a *Shigella dysenteriae* no leite, etc. A própria estrutura das bactérias e particularmente a natureza dos seus fermentos, e o seu significado patogênico têm sido estudadas por êste método.

No estudo da estrutura antigênica das bactérias, como por exemplo o *Staphylococcus*, também a imuno-fluorescência pode dar uma valiosa contribuição⁵. Análogamente o método tem-se revelado também útil na identificação de fungos.

Além da pesquisa direta das bactérias é possível também pôr em evidência pela imuno-fluorescência a presença de anticorpos no sôro, como se verificou já na brucelose e

particularmente na sífilis, onde a reação se revelou mais específica do que com os métodos clássicos de identificação da doença. Assim, sabemos que nas reações sorológicas usadas para o diagnóstico da sífilis se utiliza um antígeno lipídico com o qual reagem também soros de outros doentes, como os de malária²¹. Ora os anticorpos que se desenvolvem no sôro dos indivíduos sífilíticos são mais fácil e rapidamente reveláveis perante os treponemas pela imuno-fluorescência, com a vantagem de a reação apresentar maior especificidade, pois não se verificam falsas reações positivas. A mesma reação tem-se revelado útil para o estudo da imunidade na malária^{15, 25}, sendo de prever que a sua aplicação poderá ser também vantajosa no diagnóstico do Kala-azar e da doença do sono. Ainda pelo mesmo método se tem pretendido diferenciar a *Entamoeba histolytica* da *E. hartmanni*⁸.

Onde, porém, a utilização da imuno-fluorescência no diagnóstico microbiológico se revela mais útil é nas viroses, pela possibilidade de permitir revelar rapidamente os respectivos agentes causais.

Sabe-se, na verdade, que um dos grandes óbices do diagnóstico laboratorial destas doenças é a lentidão dos métodos usados para revelar os vírus, pois a resposta é dada em regra quando a doença está já terminada. Ora, vislumbra-se que pela imuno-fluorescência será possível revelar êsses agentes patogênicos diretamente nos produtos através dos quais são eliminados ou onde se localizam.

Assim é que, quanto à primeira possibilidade, são dignos de interêsse os trabalhos que permitiram revelar diretamente o vírus da gripe nos esfregaços do muco nasal¹⁶ e, quanto ao 2.º, merecem referência especial os trabalhos que permitiram pôr em evidência o vírus da raiva nas glândulas salivares dos animais⁹, o vírus da varíola das próprias lesões¹⁹, o vírus do herpes no conteúdo das vesículas próprias da doença³, etc.

Também por êste método se provou que as inclusões celulares observadas na psitacose são constituídas por vírus e não são de natureza celular, o mesmo se verificando com os corpúsculos de Negri na raiva. Ainda pela imuno-fluorescência se têm pôsto em evidência rickettsias nas células. Pela

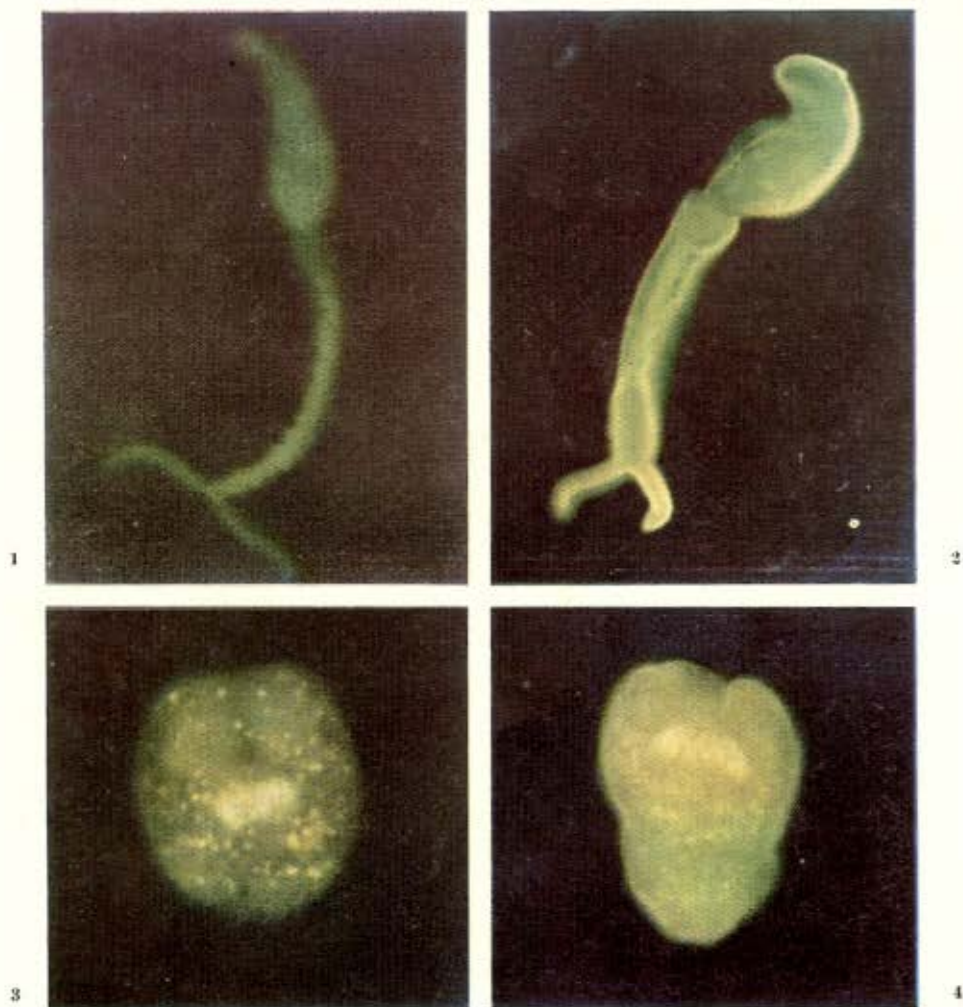


Fig. 1 — Reação negativa dum soro normal com uma cercária de *Schistosoma mansoni*.

Fig. 2 — Reação positiva dum soro de doente sofrendo de bilharziose com uma cercária de *S. mansoni*. Notar a fluorescência no contorno da cercária.

Fig. 3 — Reação negativa da imuno-fluorescência (soro humano normal com um escólex de quisto hidático de carneiro). Notar a auto-fluorescência dos ganchos.

Fig. 4 — Reação positiva da imuno-fluorescência (soro de doente sofrendo de quisto hidático, com um escólex de quisto hidático de carneiro).

mesma prova se têm revelado (LIU ^{apud} 21) anticorpos nos indivíduos atingidos de pneumonia atípica e se fez a diferenciação dos anticorpos passivos e ativos na poliomielite ²⁰.

Aparte as aplicações referidas da imuno-fluorescência, tem-se utilizado o mesmo método para o estudo das doenças por auto-anticorpos ¹¹, como por exemplo no lúpus eritematoso e na poliartrite crônica evolutiva, revelando-se para a primeira de muito maior valor do que o método usado na pesquisa direta das células LE.

À hematologia também a imuno-fluorescência tem dado apreciável auxílio e assim, de entre muitas outras aplicações, foi possível confirmar por êste método que a origem das plaquetas tinha lugar nos megacariócitos e revelou-se na anemia hemolítica a presença duma membrana fluorescente em volta dos glóbulos vermelhos. Foi ainda provado (COONS ^{apud} 21) que a síntese dos anticorpos se processava nas células linfoplasmocitárias e estaria em relação com o número de nucléolos das células.

Também a imuno-fluorescência tem contribuído para explicar as reações da hipersensibilidade, tendo sido demonstrado (GERMUTH *et al.* ^{apud} 21) que as lesões próprias do fenômeno da Arthus estavam relacionadas com a formação de um complexo antígeno-anticorpo. Pelo mesmo método tem sido possível estudar o metabolismo de certas substâncias.

Na Medicina Legal também o método tem sido utilizado na identificação do grupo sanguíneo das manchas de sangue ¹⁰, da saliva e esperma ²⁶.

Estando-nos a ocupar na aplicação do fenômeno da fluorescência, cabe aqui referir que o mesmo vem sendo aplicado no estudo de diversos fenômenos fisiológicos e com todo o sucesso na identificação de células neoplásicas no sangue circulante e assim, usando como fluorocromo a laranja de acridina, MELLO ¹⁸ revelou ultimamente a presença daquelas células em 94,6% de 353 casos de neoplasias que estudou. A laranja de acridina dá lugar, atuando sobre as células neoplásicas, a uma intensa fluorescência vermelha em microscópio ultra-violeta no seu citoplasma e nucléolos em virtude da maior riqueza aí em RNA em relação às células normais, o que pode ser comprovado

usando previamente ribonuclease, pois então a reação não se processa. Pelo mesmo processo tem sido possível também estudar o metabolismo de certas substâncias.

Em face do sucesso da aplicação da imuno-fluorescência ao diagnóstico das doenças bacterianas e das viroses, era natural que também se recorresse a êsse método de pesquisa para a identificação das parasitoses, tanto mais que nestas afecções os resultados obtidos com os métodos sorológicos clássicos se têm mostrado desencorajantes. Pensamos que as razões dêste insucesso se podem atribuir a vários fatos: a) as doenças parasitárias ou não são imunizantes ou são-no fracamente, ou ocasionam situações especiais, como seja a premunicação ou então não conhecemos a natureza da imunidade que nelas se verifica por não têmos, talvez, meios de revelar os anticorpos a que dão lugar; b) como a constituição químico-antigênica dos parasitos é muito complexa ainda não conhecemos os elementos químicos que interessa utilizar para pôr em evidência os anticorpos, e, conseqüentemente, qual a natureza dêstes; c) os parasitos apresentam estados evolutivos diversos e por isso é natural que durante o seu desenvolvimento varie a sua composição antigênica e conseqüentemente a natureza dos anticorpos que provocam.

Assim é que, por exemplo, na bilharziose, à fase de cercária segue-se a de verme adulto e depois a de ovo, sendo natural que a cada um dêstes estados devam corresponder elementos antigênicos diversos e portanto, estruturas globulínicas relativas aos anticorpos também variadas.

Ao considerarmos, porém, a prova da imuno-fluorescência deve ter-se em atenção que podem haver antígenos com auto-fluorescência, como acontece com os leucócitos, e que pode ocorrer fluorescência não específica, constituindo esta última o maior óbice às investigações por êste método.

Compreende-se, por isso, que se tenham utilizado vários processos para tirar às globulinas marcadas com que se vão praticar as reações essa possibilidade de erro, destacando-se de entre as várias técnicas, a que utiliza a globulina normal conjugada com rodamina, com a qual se trata previamente o antígeno a estudar, antes de aplicar o anti-soro marcado com o fluorocromo. Por esta técnica a fluorescência não específica devida

à rodamina é vermelho-alaranjada e a específica, devida à fluoresceína, é amarelo-esverdeada.

Tem-se recorrido² também com o mesmo fim ao glicerol a 50% com o qual se tratam previamente as preparações a estudar antes de se submeterem à ação do fluorocromo e bem assim a outros processos como seja a utilização de pó de órgãos dissecados pela acetona, etc.

A APLICAÇÃO DA IMUNO-FLUORESCÊNCIA EM PARASITOLOGIA

A aplicação da imuno-fluorescência ao diagnóstico em parasitologia tem visado a pesquisa de anticorpos específicos pela técnica indireta e tem-se já aplicado a um certo número de afecções parasitárias, pôsto que, em virtude da pouca experiência de que se dispõe, ainda não seja possível formular um juízo exato sobre o seu significado.

Assim é que o método foi aplicado ao diagnóstico da bilharziose^{22, 23}, da triquinose¹³, da filaríase bancrofti⁴, da oncocercose¹⁷ e às infecções por *Nippostrongylus muris*¹². A propósito da aplicação dos métodos imunitários ao diagnóstico das parasitoses deve-se recordar, porém, que em geral o diagnóstico etiológico se baseia na pesquisa do agente causal por métodos diretos.

No entanto, para algumas delas, a pesquisa do agente pode não ser revelável e então serão os métodos serológicos que poderão contribuir decisivamente para o diagnóstico.

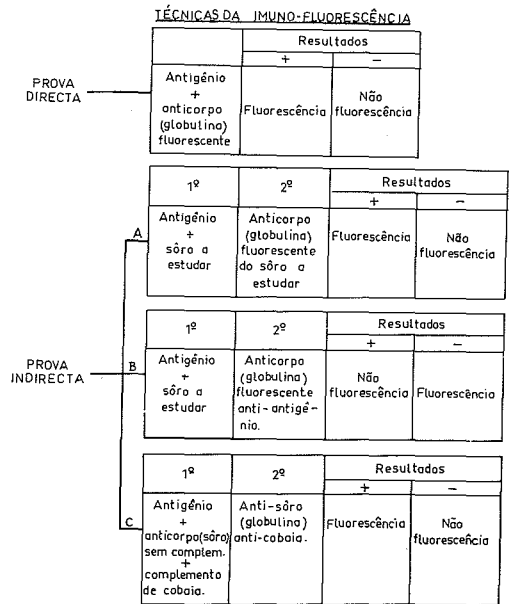
Assim acontece especialmente para a bilharziose em determinada fase da sua evolução, para a triquinose e para o paludismo. Outras há também em que os métodos de pesquisa direta do agente podem falhar, como acontece com a fasciolíase, enquanto para todas elas as provas serológicas se revestem sempre de interesse, pois certamente nos permitirão tirar deduções sobre os aspectos imunitários que lhe respeitam, da maior importância na epidemiologia, na profilaxia e na clínica.

Por todos estes motivos é compreensível que se tente por todos os meios apreciar o valor das reações imunitárias nas doenças parasitárias, donde a razão do interesse com que também nos vimos dedicando ao assunto.

OS NOSSOS ENSAIOS

Os esquemas apresentados na Fig. 1 dão indicações sobre às várias técnicas da imuno-fluorescência, onde podemos distinguir o método direto e os métodos indiretos.

Nos nossos trabalhos utilizamos sempre o método indireto (esquema abaixo) em que, portanto, o soro a estudar figura numa 1.ª fase como anticorpo e numa segunda com antígeno, tendo aplicado até à data a reação ao diagnóstico das bilharzioses e do quisto hidático, utilizando anti-soros marcados com isotiocianato de fluoresceína que obtivemos da casa "Microbiological Associates", de Bethesda. A fluoresceína é considerada um fluorocromo de eleição pela sua eficiência e porque a sua cor amarelo-verde é raras vezes encontrada como auto-fluorescência.



Bilharziose

SADUN, WILLIAMS & ANDERSON²³ tiveram em 1960 a idéia de aplicar pela primeira vez a imuno-fluorescência ao diagnóstico da bilharziose, usando ovos, miracídios, cercárias e vermes adultos como antígenos. Dado que os melhores resultados foram obtidos com cercárias, passaram a usá-las como rotina.

Técnica usada e interpretação das provas — Nos nossos ensaios usamos até à data o método indireto, utilizando ovos de *S. mansoni* e de *S. haematobium* e cercárias frescas dos mesmos parasitos, como antígeno, e soros de casos averiguadamente de bilharziose provenientes de Moçambique, da Guiné e do Brasil. Dêstes soros os provenientes da Guiné e do Brasil correspondiam seguramente a doentes, respectivamente de bilharziose vesical e intestinal, pois são as únicas formas registradas em cada um dos territórios mencionados.

Quanto aos soros de Moçambique, mesmo que o diagnóstico tivesse sido feito com mais precisão do que o método usado — pesquisa de ovos na urina e nas fezes — nunca pode haver a certeza de que não tivessem infecções mistas, visto ali existirem concomitantemente as duas formas. Os soros de Moçambique não podem, por isso, ser usados para estudos da especificidade da espécie.

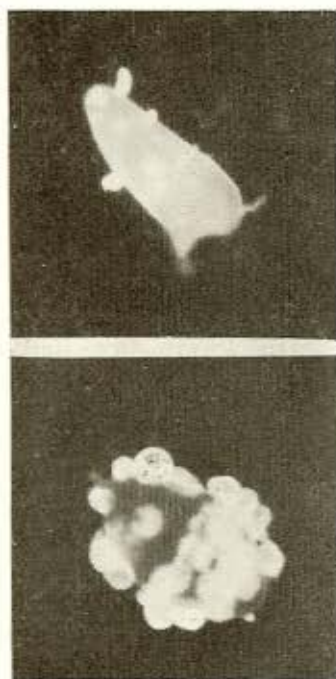


Fig. 5 — Reação positiva da imuno-fluorescência com ovos de *Schistosoma mansoni* (em cima) e de *S. haematobium* (em baixo). Notar a fluorescência do precipitado formado à volta dos ovos.

A reação processou-se melhor com soros diluídos a 1:4 pelo que os utilizamos nesta diluição e como técnica utilizamos a seguinte:

As cercárias foram concentradas em tubos de centrífuga e depois fixadas com formol a 20%, juntando cerca de um volume igual àquele que contém as cercárias. Passados 5 minutos são lavadas duas vezes em soluto tampão de fosfatos (de pH = 7,2) e deixadas sedimentar 5 a 10 minutos de cada vez. Ao sedimento junta-se uma gota de soro a estudar, diluído a 1:4 com o soluto tampão e deixa-se atuar durante 15 minutos, depois do que se torna a lavar duas vezes com o soluto tampão, da mesma forma descrita anteriormente. Esta lavagem é da maior importância, pois se não for correta pode ficar alguma globulina aderente ao antígeno e dar lugar a uma falsa fluorescência.

O sedimento coloca-se entre lâmina e lamela, preparação que se monta com uma gota de glicerol, isto é, com um meio de imersão não fluorescente; o exame é feito a seco com a ampliação de 200× em microscópio de fluorescência Zeiss, utilizando os filtros de excitação ultra-violeta intensa III + IV, ou seja abaixo de 4000 Å e os filtros de paragem 50 e 47 que permitem a passagem de radiações inferiores a 5000 Å. Paralelamente faz-se sempre uma prova com soro negativo e outra com soro positivo como testemunhas.

As reações com as cercárias são fáceis de interpretar, pois quando positivas é nítida a fluorescência à sua periferia (Figs. 1 e 2).

A prova da fluorescência circum-oval foi realizada segundo a técnica seguinte: Os ovos são concentrados e lavados em soro fisiológico, depois do que se colocam em tubo de centrífuga com uma gota do soro a estudar, tubo que é metido na estufa a 37°C durante 24 horas; seguidamente lava-se o sedimento duas vezes com soluto tampão de fosfato. Depois de sedimentados, os ovos são submetidos à ação de uma gota de globulina marcada anti-humana durante 30 minutos, após o que são novamente lavados e depois montados entre lâmina e lamela e observados com glicerol. O exame é feito com os mesmos dispositivos usados para as cercárias.

QUADRO I

Comparação dos resultados obtidos com as reações (1) peri-ovular, (2) da tumefação das cercárias, (3) da imuno-fluorescência com cercárias e (4) da imuno-fluorescência com ovos, no diagnóstico da bilharziose

Providência dos soros e tipo de doença	Reação peri-ovular		Reação da tumefação das cercárias		Reação da imuno-fluorescência com cercárias		Reação da imuno-fluorescência com ovos	
	N.º	Positivos (%)	N.º	Positivos (%)	N.º	Positivos (%)	N.º	Positivos (%)
MOÇAMBIQUE								
Vesical	57	93,0	57	73,6	9	88,9
Intestinal	19	84,2	19	57,9	6	100,0	9	88,9
Mista	10	100,0	10	90,0
Total	86	91,9	86	71,7				
GUINÉ								
Vesical	49	93,8	49	95,9	49*	97,9	9** 6***	100,0 —
BRASIL								
Intestinal	15	80,0	15	93,3	12	91,6	15	66,6
PORTUGAL								
Sem doença	20	—	20	—	25	—	6	—
Sífilis	2	—	7	—	8	—	1	—
Outras	3	—	2	—	2	—

Obs. — Com as exceções referidas, as provas foram praticadas com ovos e cercárias de *S. mansoni*.

* Quatro reações foram efetuadas com cercárias de *S. haematobium*.

** Ovos de *S. haematobium*.

*** Ovos de *S. mansoni*.

Verificamos também, como já foi referido por outros autores²⁴, que a fluorescência nos ovos se processa nos grânulos ou digitações que se formam à superfície da sua casca quando a reação peri-ovular é positiva (Fig. 5). Nas reações negativas os ovos apresentam auto-fluorescência, mas amarelacastanhada, muito diferente, pois, da amarelo-esverdeada própria da fixação da fluoresceína.

Resultados — Até à data, a reação com as cercárias foi praticada com 45 soros de doentes com bilharziose, em 22 casos de indivíduos considerados normais, em 7 com sífilis e em 3 com outras parasitoses.

No que respeita a esta prova, verificou-se que as reações foram negativas com os soros normais, enquanto que com os soros de

doentes houve 40 fortemente positivas, 5 fracamente positivas e uma duvidosa. O sôro dêste último caso deu também resultados duvidosos com outras provas, o que se poderá explicar talvez pelo seu baixo teor em anticorpos, por se tratar possivelmente de uma infecção recente ou por outro motivo que nos escapa.

A reação foi negativa em 6 casos de sífilis e de ascaridose, e duvidosa em 1 de sífilis, em 2 casos de tricocefalose e num de lambliose.

Os resultados obtidos na reação de imuno-fluorescência com ovos constam do quadro I e por êle se vê que a prova foi positiva perante ovos de *S. mansoni* em 8 casos de 9 com bilharziose intestinal de Moçambique e em 10 de 15 do Brasil; revelou-se, porém, negativa em 6 soros de casos de bilharziose

vesical perante ovos de *S. mansoni*. Com 4 soros normais a reação foi sempre negativa. Com os ovos de *S. hematobium* foi negativa nos casos de B. intestinal do Brasil e positiva em todos os 9 casos ensaiados de B. vesical da Guiné.

Comparando os resultados da imuno-fluorescência com os verificados por nós com a reação peri-ovular e a reação de tumefação das cercárias, verificamos (Quadro I) que a reação de imuno-fluorescência com cercárias revela uma maior percentagem de positivities e porque é de mais fácil interpretação, cremos que se deve generalizar. Esperamos, entretanto, um maior número de ensaios para precisarmos a sua especificidade e o seu valor.

É de notar também que a mesma reação aplicada aos ovos não nos deu uma tão grande percentagem de positivities, como a obtida com as cercárias, embora pareça ainda mais específica que a reação peri-ovular, porquanto não se deram reações cruzadas entre as espécies *S. mansoni* e *S. hematobium*.

Quisto hidático

É certamente o quisto hidático a parasitose que dispõe de provas mais precisas para o diagnóstico, como sejam as de Casoni e de Weinberg. No entanto, quanto à reação de Casoni verifica-se numa taxa de positivizados mais bem controlados¹⁴ a taxa de positivities nas formas correntes de localização do quisto hidático vai até 89%, enquanto podem ocorrer falsas reações positivas em cerca de 5%. Além disso, a reação exige cuidados especiais na sua própria execução, na leitura, no líquido hidático a usar e quanto à interpretação, pois se processa em dois tempos sem que se conheçam as razões deste fenômeno. Demais, a reação de Casoni verifica-se numa taxa de positivities menor do que a referida, quando se trata de quistos hidáticos ocorrendo fora do seu habitat corrente, como por exemplo, no sistema ósseo ou nervoso, talvez porque a larva não tem então possibilidade de originar anticorpos, pelas dificuldades que encontra ao seu normal desenvolvimento.

A reação de Weinberg é considerada menos fiel, atribuindo-se-lhe⁷ uma percenta-

gem de positivities de cerca de 83%, portanto inferior à de Casoni, e menor especificidade, além de ser de técnica relativamente mais delicada e mais sujeita a erros.

Ora, o quisto hidático é uma parasitose que, manifestamente, dá lugar a fenômenos que têm expressão no sangue do hospedeiro e de que a eosinofilia, as reações alérgicas e várias provas serológicas clássicas são testemunho evidente.

Técnica usada e interpretações das provas — Pensamos, por isso, aplicar a imuno-fluorescência ao diagnóstico do quisto hidático para revelar a presença de anticorpos, utilizando como antígeno os escólices do quisto, já que tais formações são verdadeiramente os elementos ativos da larva. Numa comunicação prévia apresentada à Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa, em janeiro do corrente ano, tivemos ensejo de dar conta dos nossos primeiros resultados¹.

De então para cá procedemos a novas provas utilizando escólices de quisto hidático de carneiros seguramente infectados, por punção dos quistos e concentrados por sedimentação. Como anti-soros usamos soros humanos de casos portadores desta parasitose, confirmados operatòriamente e soros de carneiros seguramente infectados, por constatação na necropsia, do Matadouro Municipal de Lisboa.

Dois métodos pusemos em prática: o método seco, em que os escólices foram fixados pelo calor, e o método úmido em que uma gota de centrifugado do líquido era posta em contacto com o soro a ensaiar num tubo de centrifuga. Tanto num como noutro método seguiram-se as fases correntes do método indireto da reação que adiante descrevemos.

O soro do doente foi deixado em contacto com os escólices durante uma hora, tempo suficiente para que a reação se processe. Os soros foram ensaiados sem qualquer diluição, e na diluição de 1:2, de 1:4 e de 1:64, o mesmo acontecendo com o anti-soro marcado com o fluorocromo. Os melhores resultados foram obtidos com as diluições de 1:4.

Como verificássemos que nos primeiros ensaios o método úmido nos dava melhores resultados foi este que usamos nas várias provas, segundo a técnica seguinte: Os es-

cólices são fixados em formol a 20%, imediatamente ou após terem sido colocados num soluto de rodamina a 1:150 durante 60 minutos.

Passados 5 a 10 minutos são lavados em soluto tampão de fosfato por 2 vezes e então submetidos durante 60 minutos à ação do sôro a estudar, que é diluído a 1:4 com o soluto tampão. Os escólices lavam-se novamente por 2 vezes e junta-se-lhes então uma gôta de globulina anti-humana ou anti-carneiro, conforme o sôro que primitivamente se empregou, a qual se deixa atuar durante 15 minutos. Tornam-se a lavar 2 vezes em tampão, montam-se com glicerol em lâmina e cobrem-se com lamela para se fazer o exame nas condições atrás referidas.

Fizemos também numerosos ensaios para estabelecer uma concentração ótima da globulina e do sôro que desse sempre resultados negativos com os soros normais e positivos com os soros de indivíduos ou animais portadores de quisto hidático.

Últimamente parece-nos ter chegado a um resultado bastante animador, usando a técnica e diluições referidas.

Nestas condições os escólices apresentam-se nos soros normais com uma coloração esverdeada, enquanto nos soros de doentes têm a mesma coloração, mas são circundados por um halo fluorescente (Figs. 3 e 4).

O uso da rodamina torna mais aparente esta fluorescência visto que cora o escólex de cor alaranjada, notando-se, portanto, melhor o halo amarelo-esverdeado próprio da reação.

Neste estudo ensaiamos soros humanos de 6 casos de quisto hidático comprovado cirurgicamente, 2 de casos suspeitos e sôros de pessoas normais, ou pelo menos, seguramente livres de quisto hidático.

Por outro lado, fizemos vários ensaios com soros de carneiros normais e parasitados com quisto hidático.

Resultados

Os fatos observados constam do Quadro II, pelo qual se verifica que os primeiros resultados obtidos são animadores.

Devemos dizer que os melhores resultados foram verificados com escólices fixados no formol, os quais conservaram as suas propriedades por um período não superior a uma semana, mas os escólices tratados pela rodamina mantinham melhor o seu aspecto e propriedades antigênicas.

QUADRO II

Resultados da reação da imuno-fluorescência aplicada ao diagnóstico do quisto hidático

Soros	Número de reações	Resultado		
		Positivo	Negativo	Duvidoso
De carneiros:				
normais	34	1	23	10
c/ hidátides .	14	14	—	—
Humanos:				
normais	17	—	10	7
c/ hidátides .	6 *	5	1	—
sifilíticos	3	—	3	—
c/ bilharziose vesical	2	—	1	1

* Um caso operado de quisto hidático do baço, em 1957, deu reação de imuno-fluorescência negativa.

A fluorescência dos escólices postos em contacto com o sôro de doentes mostrou-se nítida, mas foi nula ou duvidosa nas provas feitas com 3 soros de sifilíticos e 2 soros de doentes com bilharziose vesical. Como testemunhas e contrôles usamos sôro normal e praticamos reações sem qualquer sôro e com globulina marcada, só com sôro e sem globulina e escólices sem qualquer preparação. Notamos, porém, que os ganchos dos escólices apresentavam auto-fluorescência (Fig. 3), pois era evidente na ausência do sôro de doentes. Nalguns casos interpretamos a reação como duvidosa, quando eram poucos os escólices com fluorescência e esta era pouco nítida. Cremos que êstes resultados poderão estar em relação com o estado

de vitalidade dos escólices, pois é natural que disso dependa o seu valor antigênico, o que iremos tentar esclarecer.

Verificamos também que nos deixaram algumas dúvidas de interpretação as provas feitas com os soros de doentes com bilharziose, pois revelaram uma certa fluorescência, se bem que menos intensa que a verificada com os soros de doentes com quisto hidático. É evidente que aqui se levanta o assunto respeitante à interpretação a dar ao grau de fluorescência ou ao fenômeno da fluorescência não específica, que, como se sabe, constitui um dos óbices do método que aguarda ainda a devida solução.

Quanto ao valor a atribuir à intensidade da fluorescência, é evidente que pode variar sob a influência de diversos fatores, mas pensamos que a medição dessa intensidade, através de um micro-fluorômetro, mantendo todas as condições de experiência rigorosamente iguais, poderá ser utilizada como meio de apreciação do valor de reação. Impõem-se, por isso, também a realização da prova em sala perfeitamente climatizada.

CONCLUSÕES

Em face do que vimos de expôr é indiscutível que a imuno-fluorescência constitui uma prova conveniente para o diagnóstico da bilharziose e do quisto hidático.

Para a bilharziose, os resultados que obtivemos usando cercárias como antígeno, deram-nos uma percentagem de positividade maior do que a verificada com os ovos. Com estes, porém, parece que a prova se revela mais específica, pois soros de indivíduos infectados com *S. haematobium* não reagiram com ovos de *S. mansoni*, embora o número de casos seja escasso para tirarmos conclusões definitivas.

No que respeita ao quisto hidático, parece que estamos também em presença duma prova de interesse para o seu diagnóstico, interesse resultante da sua simplicidade de execução e facilidade de interpretação, além de que nos parece lógico o princípio em que assenta: a utilização direta dos elementos antigênicos ativos, os escólices, certamente os responsáveis pela formação dos anticorpos, cuja existência nos portadores de quisto hidático é inegável.

No que respeita à sua especificidade, à sua frequência e aos fatores que podem interferir com a reação é claro que não temos ainda dados bastantes para nos pronunciarmos definitivamente, pois pudemos dispôr de poucos soros de doentes e foram reduzidas as variantes ensaiadas, já que só consideramos algumas respeitantes à técnica da prova, à diluição dos soros e ao tempo de contacto dos produtos utilizados.

Entretanto, a reação foi negativa com soros normais e soros de sífilíticos e duvidosa com soros de casos de bilharziose vesical, helmintíase devida a um verme relativamente aparentado, pelo menos zoológicamente, embora não biologicamente, com a *Echinococcus granulosis*.

Apesar, no entanto, do escasso número de casos em que se baseia este estudo e apesar de não termos podido ainda comparar a presente reação com as reações de Casoni e de Weinberg, julgamos de interesse apresentar desde já os resultados obtidos por nos parecer que a reação merece, pelas razões expostas, ser largamente aplicada.

Também é nossa intenção continuar o trabalho, praticando a reação segundo diversas modalidades e em que se considerará a conservação e a variação possível do poder antigênico dos escólices, a influência da diluição dos soros, a especificidade da prova e muitos outros aspectos que seria fastidioso inumerar. É possível que esta reação nos permita ainda seguir a evolução da taxa de anticorpos, o que seria de grande vantagem sobretudo para a apreciação do quisto hidático recidivante.

SUMMARY

Immunofluorescent reaction, applied to the parasitological diagnosis.

The indirect immunofluorescent reaction applied to the bilharziasis diagnosis, using the inactivated serums to be tested, cercariae and eggs as antigens, and fluorescein isothiocyanate as fluorochrome, proved to be of great interest. When using *S. mansoni* cercariae, the rate of positive results was 98% in 45 serums of vesical bilharziasis patients, while when using *S. haematobium* cercariae positive results were noticed in the

4 serums of the same type of disease, an insufficient number to allow us to conclude that this reaction is more specific than others. All results were negative with normal serums.

When using the eggs as antigens, the reaction seems to be really species specific since it was not noticed in 6 vesical bilharziasis cases with *S. mansoni* eggs, and since it was positive in 9 cases of the same disease type with *S. haematobium* eggs.

With *S. mansoni* eggs the intestinal bilharziasis cases from Mozambique showed 88% of positive results, and the ones from Brazil only 66.6%, which is perhaps related to the fact that these latter serums were already quite contaminated.

However, with *S. haematobium* eggs all results were negative, the same happening in the reactions performed with normal serums with any species of eggs.

Also of interest is the fact that in 2 normal serum cases circum-oval precipitin reaction was noticed, though only of the + degree, but the small bubbles of precipitate did not take fluorescence.

The immunofluorescent reaction applied to the diagnosis of the hydatid cyst, using scolices of the hydatid cyst of the lamb as antigens, was positive in 100% of 14 serums of parasited lambs and was negative in 23 of 34 normal cases used as witness, but it was doubtful in 10 cases and positive in one case. In 6 human cases of hydatid cyst the reaction was positive in 5 and negative in 1, and in 20 serums of individuals not suffering of this parasitosis it was doubtful in 7 and negative in the remaining.

BIBLIOGRAFIA

1. AZEVEDO, J. Fraga de & ROMBERT, P. C. — A aplicação da imuno-fluorescência no diagnóstico do quisto hidático. J. Soc. Sc. Med. 127:345, 1963.
2. BEUTNER, E. H. — Imunofluorescent staining: the fluorescent antibody method. Bact. Rev. 25:49-76, 1961.
3. BIEGELEISEN, J. Z.; SCOTT, L. V. & LEWIS, V. — Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections with fluorescent antibody. Science 129:640-641, 1959.
4. CHOWDHURY, A. B. & SCHILLER, E. L. — Preliminary observations on the application of the fluorescent antibody technique in the laboratory diagnosis of filariasis. Bull. Calcutta School trop. Med. 10: 97-99, 1962.
5. COHEN, J. O. & DEDING, P. — Serological typing of Staphylococci by means of fluorescent antibody. J. Bact. 87:735-741, 1962.
6. COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. & BERLINER, E. — The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. J. Immunol. 45:159-170, 1942.
7. FAUST, E. R. & RUSSELL, P. F. — Craig and Faust's Clinical Parasitology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1957.
8. GOLDMAN, M. & GLEASON, N. N. — Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. IV. Relationships of two strains of *E. histolytica* and one of *E. hartmanni* demonstrated by cross-absorption techniques. J. Parasit. 48: 778-783, 1962.
9. GOLDSWASSER, R. A.; KISSLING, R. E. & CARSKI, T. R. — Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary gland of rabbit animals. Bull. O.M.S. 20:579-588, 1959.
10. HASEBE, H. — Determination of ABO blood groups in human blood stains by the fluorescent antibody technique. Jap. J. Leg. Med. 16:325-329, 1962.
11. HIJMANS, W.; SCHUIT, H. R.; LEEUW, B. de, & MOLLER, H. F. — The diagnostic significance of antinuclear serum factors determined with the aid of fluorescent antibodies. Neederl. T. Gennesk. 106:2097-2101, 1962.
12. JACKSON, G. J. — Fluorescent antibody studies of *Nippostrongylus muris* infection. J. infect. Dis. 106:20-36, 1960.
13. JACKSON, G. J. — Fluorescent antibody studies of *Trichinella spiralis* infections. J. infect. Dis. 105:97-117, 1959.
14. JOLLY, A. — Réaction de Casoni et kyste hydatique. Valeur de la réaction. Étude statistique des concordances et discordance des réponses de la réaction avec l'observation clinique des malades. Maroc Médical 398:773-778, 1958.
15. KUVIN, S. F.; TOBIE, J. E.; EVANS, Ch. B.; COATNEY, G. R. & CONTACOS, P. G. — Production of malarial antibody. Determination by the fluorescent-antibody technique. In KUVIN et al. — Symposium on Malaria. JAMA 184(12):943-945, 1963.

16. LIU, C. — Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein-labeled antibody. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 92:883-887, 1956.
17. LUCASSE, Chr. — Fluorescent antibody test for Onchocerciasis. Zeit. Tropenmed. Parasit. 13:404-408, 1962.
18. MELLO, R. P. & KASTNER, M. R. Q. — Importância e identificação de las células neoplásicas en la sangre periférica. Sangre (Barcelona) 7:404-417, 1962.
19. MURRAY, H. G. S. — The diagnosis of Smallpox by immunofluorescence. The Lancet, n.º 728, 847-848, vol. I for 1963.
20. RIGGS, J. L. & BROWN, G. C. — Differentiation of active and passive poliomyelitis antibodies in human sera by indirect immunofluorescence. J. Immun. 89:868-878, 1962.
21. ROSNAY, D. de & BOINEAU, J. — Une méthode d'investigation immunologique d'intérêt très général; l'immunofluorescence. J. Med. Bordeaux 10:1453-1470, 1962.
22. SADUN, E. H.; ANDERSON, I. J. & WILLIAMS, J. S. — The nature of fluorescent antibody reactions in infections and artificial immunizations with *Schistosoma mansoni*. Bull. Org. Mond. Santé 27:151-159, 1962.
23. SADUN, E. H.; WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. — A fluorescent antibody technic for the sero-diagnosis of Schistosomiasis in humans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105:289-291, 1960.
24. SALA, A. R.; MENENDEZ-COVADA, R. & RODRIGUEZ-MOLINA, R. — Detection of circumoval precipitins by the fluorescent antibody technic. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111:212-215, 1962.
25. VOLLER, A. — Fluorescent antibody studies on malaria parasites. Bull. W. H. O. 27:283-287, 1962.
26. YAMASAWA, K. — Blood grouping of saliva and semen stains by the use of fluorescein-labelled antibodies. Jap. J. Leg. Med. 16:238-241, 1962.

Recebido para publicação em 5 setembro 1963.