

## A REAÇÃO PERI-OVULAR NO DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

J. PELLEGRINO e Fidalma de Oliveira ANDRADE

### RESUMO

A reação peri-ovular foi praticada com o sêro de 164 pacientes com esquistossomose mansônica e de 83 indivíduos seguramente livres desta infecção. A reação foi positiva em 71,3% dos pacientes com esquistossomose e em 7,2% (falsos positivos) dos indivíduos tomados como controle.

Em 18 pacientes com esquistossomose e com reação peri-ovular completamente negativa o teste cutâneo com antígeno de esquistossomos foi positivo em 11 (61,1%) e a reação de fixação do complemento positiva em 13 (72,2%). Em 17 pacientes, pelo menos uma das duas provas resultou positiva.

Em 46 indivíduos com esquistossomose e nos quais a reação peri-ovular havia sido fortemente positiva, o teste cutâneo foi positivo em 37 (80,4%) e a reação de fixação do complemento em 43 (93,5%). Em todos os casos, pelo menos uma das duas provas resultou positiva.

Ficou evidente que a reação peri-ovular não apresenta vantagens sobre a reação intradérmica e a reação de fixação do complemento no diagnóstico da esquistossomose mansônica. Estas duas provas, praticadas simultaneamente, permitem evidenciar a quase totalidade dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.

Foi salientada a importância de se adotar um critério quantitativo na interpretação dos resultados da reação peri-ovular. O valor desta prova imunológica no controle de cura da esquistossomose precisa ser investigado com maior detalhe.

### INTRODUÇÃO

Em 1954, OLIVER-GONZALEZ<sup>9</sup> descreveu um interessante fenômeno: quando ovos de *S. mansoni* são incubados a 37°C com sêro de pacientes com esquistossomose, formam-se precipitados em torno de ovos contendo miracídio vivo. Estes precipitados se apresentam sob a forma de glóbulos ou "bólgas" de tamanho variável ou constituindo longas cadeias como se fossem "segmentos de tênia". Esta nova reação imunológica recebeu o nome de "circumoval precipitin reaction" (OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>11</sup>).

O precipitado que se forma em torno dos ovos pode ser visto após 2 horas de incuba-

ção a 37°C, mas torna-se mais evidente depois de 24 horas. A formação do precipitado é eliminada se o sêro for absorvido previamente com ovos vivos ou liofilizados. A absorção do sêro com cercárias ou esquistossomos adultos não interfere na reação, o que sugere a existência de material antigênico próprio ao ovo. O precipitado é visto somente em torno de ovos com miracídio vivo, o que leva a crer que a substância antigênica esteja presente dentro do ovo e talvez seja constituída por secreção ou excreção do miracídio ou pelo fluido que banha o embrião ciliado (OLIVER-GONZALEZ<sup>9</sup>). OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>11</sup> verificaram que a reação peri-ovular não apresenta ape-

nas uma especificidade de estágio (demonstrada pelas provas de absorção), mas, também, uma especificidade em relação às espécies do gênero *Schistosoma*. De fato, não há reação cruzada quando ovos de *S. haematobium* ou *S. japonicum* são usados como antígeno e há apenas formação de discreto precipitado quando ovos de *S. mansoni* são incubados com soros de pacientes infectados pelo *S. haematobium* ou *S. japonicum*.

O valor da reação peri-ovular no diagnóstico da esquistossomose foi estudado nos trabalhos de OLIVER-GONZALEZ<sup>9</sup>, OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>10</sup>, NEWSOME<sup>8</sup>, RODRIGUEZ-MOLINA, OLIVER-GONZALEZ & SERRANO<sup>18</sup> e KLOETZEL<sup>6</sup>. Segundo os autores citados, esta reação seria dotada de grande sensibilidade e elevada especificidade para infecções por *Schistosoma*. No grupo de pacientes estudados por ANDERSON & NAIMARK<sup>1</sup>, a sensibilidade da reação peri-ovular foi de 88%. OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>10</sup> mostraram que a intensidade da reação peri-ovular e a percentagem de ovos com precipitado é significativamente maior nos casos de doença crônica do que na infecção recente.

A possibilidade de se utilizar a reação peri-ovular como controle de cura na esquistossomose foi sugerida nos trabalhos de OLIVER-GONZALEZ, RAMOS & COKER<sup>12</sup> e OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>10</sup>. Reações feitas após tratamento específico começam a diminuir de intensidade já aos 60-120 dias, tornando-se negativas, na quase totalidade dos casos curados, após 6 meses. Os dados de KLOETZEL<sup>6</sup> confirmam estas observações. A negatização da reação peri-ovular após tratamento com "fuadina" foi também verificada em camundongos experimentalmente infectados com *S. mansoni* (RODRIGUEZ-MOLINA & col.<sup>17</sup>).

A demonstração de que os precipitados que aparecem em torno de ovos de *S. mansoni*, quando incubados com soro de pacientes com esquistossomose, constituem complexos antígeno-anticorpo, foi dada por LEWERT, LEE & JACKSON<sup>apud 3</sup>, usando anticorpos específicos marcados com isocianato de fluoresceína. O fracionamento de imune-soros pela eletroforese em papel (CANCIO, DE SALA & RODRIGUEZ-MOLINA<sup>2</sup>) e em amido (LEE & LEWERT<sup>7</sup>) possibilitou a localização da fração

imunologicamente ativa na faixa correspondente à  $\gamma_1$ -globulina.

No presente trabalho descrevemos um critério quantitativo para a leitura da reação peri-ovular e procuramos estabelecer o valor desta prova no diagnóstico da esquistossomose mansônica.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*Pacientes com esquistossomose e controles* — A reação peri-ovular foi praticada em 164 indivíduos com esquistossomose mansônica parasitológicamente comprovada, sendo 154 pelo exame de fezes e 10 pela biopsia retal. A idade variou de 5 a 72 anos, sendo que em 129 pacientes estava compreendida entre 10 e 40 anos. Dos pacientes com esquistossomose, 117 eram do sexo masculino e 47 do sexo feminino. A reação peri-ovular foi feita também em 83 indivíduos moradores em zona sem esquistossomose (Florianópolis, Santa Catarina), sendo 61 do sexo masculino e 22 do sexo feminino. A idade destes indivíduos variou de 10 a 43 anos.

*Obtenção de ovos de S. mansoni* — Ovos de *S. mansoni* foram isolados do intestino de camundongos experimentalmente infectados, após 8 a 10 semanas de doença, seguindo, em linhas gerais, a técnica descrita por PELLEGRINO<sup>13</sup>. O intestino delgado de 3 a 4 camundongos era retirado, aberto longitudinalmente e lavado em água corrente. Em seguida o material era colocado em placa de Petri contendo solução salina a 1,4% e deixado na estufa a 37°C durante 2 horas. Depois de raspar a mucosa intestinal com uma lâmina de microscopia, a suspensão era homogeneizada em liquidificador durante 2 minutos e filtrada através de 4 camadas de gaze. Sedimentações sucessivas do material em salina a 1,4%, feitas em cristalizador de vidro (12 cm de diâmetro; 6 cm de altura) proporcionam ovos de *S. mansoni* praticamente livres de contaminantes (Fig. 1). Em geral a primeira sedimentação requer 15 minutos; 4 a 5 minutos são suficientes para cada uma das sedimentações seguintes.

*Técnica da reação e interpretação dos resultados* — A reação peri-ovular foi prati-



Fig. 1 — Ovos de *S. mansoni* isolados do intestino de camundongo experimentalmente infectado.

cada colocando-se sobre uma lâmina 0.1 ml do soro a ser examinado (prêviamente inativado a 56°C durante 30 minutos) e 0.05 ml de suspensão de ovos de *S. mansoni* em solução salina a 1.4%, contendo 100 unidades de penicilina por ml. A preparação era recoberta com laminula untada nos bordos com vaselina e finalmente incubada a 37°C durante 24 horas.

Na interpretação dos resultados procurou-se exprimir a intensidade da reação segundo um critério quantitativo, pois havia sido referido (PELLEGRINO<sup>13</sup>) que reações pouco intensas podem ser observadas em soros de indivíduos seguramente livres de infecção esquistossomótica. Como ponto de referência foi considerada a área relativa do ovo de *S. mansoni*, visto ao microscópio. As áreas correspondentes às formações em "bolha" ou em "cadeia", observadas em tórno de cada ovo, foram anotadas esquematicamente e a sua soma comparada com a área correspondente à do ovo (Fig. 2). Os resultados para cada ovo foram assinalados em "pontos" como se segue: 1 = área correspondente a  $\frac{1}{4}$  do ovo; 2 = área correspondente à metade da área do ovo; 3 =

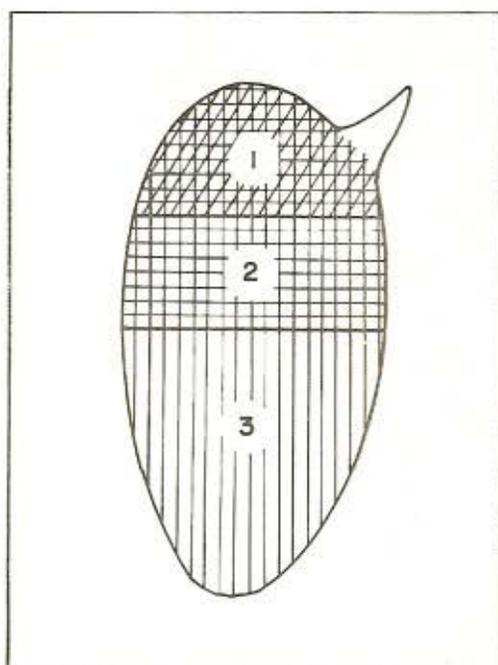


Fig. 2 — Desenho esquemático para mostrar o critério utilizado na leitura da reação peri-ovular (ver texto).

área maior do que a metade do óvulo, mas inferior à área total do óvulo; 4 = área superior àquela correspondente ao óvulo. Valores inferiores a 1, isto é, correspondentes a áreas menores do que 1/4 do óvulo, somente foram levados em conta quando as formações em torno do óvulo eram "em cadeia", sendo anotados como 0,5. Foram observados, para cada soro, 100 ovos maduros com miracídio vivo. A soma dos "pontos" dividida por 100 serviu como medida da reatividade do soro ( $r$ ). Quando o valor de  $r$  era igual ou superior a 5, considerava-se a reação como positiva.

*Teste cutâneo e reação de fixação do complemento* — A reação intradérmica com antígeno de esquistossomos (*S. mansoni*), contendo 40  $\mu\text{g}$  N/ml (cf. PELLEGRINO & MACEDO<sup>15</sup>) e a reação de fixação do complemento (PELLEGRINO & FREITAS<sup>14</sup>) foram praticadas em 64 pacientes com esquistossomose: 18 casos com a reação peri-ovular negativa ( $r = 0$ ) e em 46 casos com valores de  $r$  superiores a 20.

#### RESULTADOS

Os resultados da reação intradérmica praticada com o soro de 164 pacientes com esquistossomose e de 83 controles acham-se resumidos no Quadro. Os valores de  $r$  foram iguais ou superiores a 5 (reações positivas) em 71,3% dos pacientes com esquistossomose e em 7,2% (falsos positivos) dos indivíduos tomados como controle. O valor de  $r$  foi igual a zero em 25 pacientes com esquistossomose e em 60 dos 83 soros de indivíduos sem esquistossomose.

Em 18 pacientes com esquistossomose e com reação peri-ovular completamente negativa ( $r = 0$ ), a reação intradérmica foi positiva em 11 (61,1%) e a reação de fixação do complemento em 13 (72,2%). Em 17 casos, pelo menos uma das reações resultou positiva.

Em 46 indivíduos com esquistossomose e nos quais a reação peri-ovular havia sido fortemente positiva (valores de  $r$  superiores a 20), a reação intradérmica foi positiva em 37 (80,4%) e a reação de fixação do com-

plemento em 43 (93,5%). Em todos os casos, pelo menos uma das reações foi positiva.

#### QUADRO

Reação peri-ovular em soros de pacientes com esquistossomose e em indivíduos tomados como controle

Valores de $r$	Pacientes com esquistossomose	Controles
0	25	60
1 a 2	11	6
3 a 4	11	11
	28,7%	92,8%
5 a 6	5	1
7 a 8	11	4
9 a 10	3	1
11 a 15	19	
16 a 20	12	
21 a 30	25	
31 a 40	8	
41 a 50	11	
51 a 60	4	
61 a 100	14	
> 100	5	
	71,3%	7,2%
Total . . . . .	164	83

#### DISCUSSÃO

Em camundongos e macacos experimentalmente infectados com *S. mansoni*, o aparecimento de anticorpos responsáveis pela reação peri-ovular é relativamente precoce e coincide, aproximadamente, com o início da eliminação de ovos nas fezes (COKER & OLIVER-GONZALEZ<sup>3</sup>, SENTERFIT<sup>19</sup>, KLOETZEL<sup>6</sup>). Os anticorpos somente são evidenciados quando a infecção é produzida por esquistossomos de ambos os sexos (OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>10</sup>, SENTERFIT<sup>19</sup>). No homem, embora tenha sido constatada a positividade da reação peri-ovular em casos de infecção recente, esta prova torna-se mais evidente na fase crônica (OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>10</sup>, KLOETZEL<sup>6</sup>).

A reação peri-ovular foi considerada como altamente específica para o grupo *Schistosoma*, apesar do número relativamente pequeno de soros de indivíduos seguramente

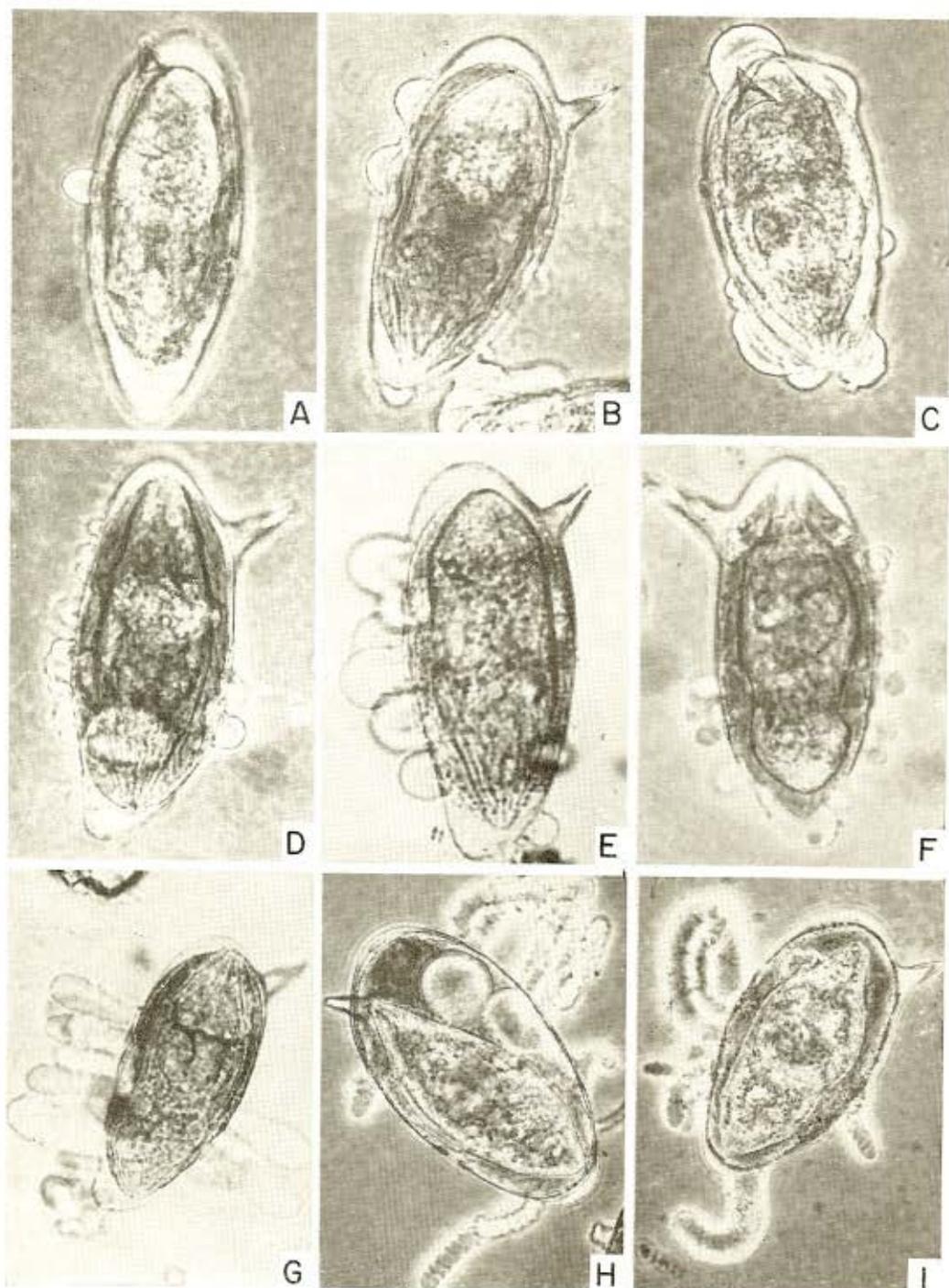


Fig. 3 — Diferentes tipos de precipitado em tôrno de ovos de *S. mansoni* incubados com sôro de pacientes com esquistossomose. A a F: reações em "bóia", com diferentes intensidades. G. a I: reações em "segmentos de tênia".

livres de infecção esquistossomótica, nos quais ela foi testada (OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>10</sup>). KLOETZEL<sup>6</sup> assinala falsa reação positiva em menino com febre reumática. Nossa experiência não se superpõe à dos autores que nos precederam. De fato, praticando a reação peri-ovular no soro de 83 indivíduos sem esquistossomose, constatamos, com certa freqüência, o encontro de pequenas formações em "bôlha", de regra isoladas (Fig. 3, A) e em pequena percentagem de ovos. Este achado prejudica sobremaneira a leitura da reação peri-ovular, uma vez que tais formações podem ser encontradas em ovos incubados tanto com soro de pacientes com esquistossomose como em soro de indivíduos não infectados. É preciso salientar, entretanto, que formações em "cadeia" ou em "segmentos de tênia", mesmo pequenos, sômente são encontradas quando os ovos são incubados com soro de pacientes com esquistossomose (Fig. 3, G, H, I). A especificidade da reação peri-ovular tornar-se-ia baixa se tôdas as formações em "bôlha", mesmo isoladas, fôsem tomadas em consideração. Por este motivo desenvolvemos um nôvo critério de leitura, visando aumentar a especificidade da reação, sem contudo prejudicar de maneira apreciável a sua sensibilidade. Já KLOETZEL<sup>6</sup>, em 1959, havia proposto um critério quantitativo para interpretar os resultados da reação peri-ovular. Mesmo assim, reações com valores de  $r$  compreendidos entre 5 e 9, foram constatadas em 7,2% dos indivíduos sem esquistossomose (Quadro). Se o critério para se considerar uma prova como positiva fôsse modificado, deslocando-se  $r$  de 4 para 9, a especificidade da reação tornar-se-ia maior (apenas 1,2% de falsas reações positivas), mas a sua sensibilidade cairia de 71,3% para 61,6%. É possível que tanto a sensibilidade como a especificidade da reação peri-ovular possam ser melhoradas com o auxílio da prova de imuno-fluorescência indireta (anti- $\gamma$ -globulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína). Estudos nesse sentido estão sendo realizados em nosso laboratório.

Nos pacientes com esquistossomose não houve diferença estatisticamente significativa dos resultados, tanto em relação ao sexo como em relação à idade (crianças  $\times$  adultos).

A comparação da reação peri-ovular com o teste cutâneo e a reação de fixação do complemento mostra que, do ponto de vista prático, a reação peri-ovular não apresenta vantagens sôbre as duas outras provas imunológicas no diagnóstico da esquistossomose. Como já havia sido salientado anteriormente, quando o teste cutâneo e a reação de fixação do complemento são praticados simultaneamente, a quase totalidade dos indivíduos infectados por *S. mansoni* pode ser evidenciada (PELLEGRINO & col.<sup>16</sup>).

Uma vez que existem evidências, tanto de ordem clínica (OLIVER-GONZALEZ, RAMOS & COKER<sup>12</sup>, OLIVER-GONZALEZ, BAUMAN & BENENSON<sup>10</sup>, KLOETZEL<sup>6</sup>) como experimental (RODRIGUEZ-MOLINA & col.<sup>17</sup>), de que a reação peri-ovular tende a tornar-se negativa depois do tratamento específico, é possível que este teste imunológico venha a desempenhar papel importante no contrôle de cura da esquistossomose. Este campo de estudos merece ser desenvolvido.

#### SUMMARY

*The circumoval precipitin reaction in the diagnosis of schistosomiasis mansoni.*

The circumoval precipitin test was performed with the sera of 164 patients with active schistosomiasis mansoni and with the sera of 83 uninfected controls. The test was positive in 71.3 per cent of the schistosome patients and in 7.2 per cent (false positive) of the controls.

The intradermal and complement fixation tests, using adult worm (*S. mansoni*) antigens, were positive in 61.1 and 72.2 per cent, respectively, in a group of 18 patients with schistosomiasis but negative circumoval test. In all but one patient at least one of these tests was positive.

In a group of 46 schistosome patients showing a strongly positive circumoval test, the intradermal and complement fixation tests were positive in 80.4 and 93.5 per cent, respectively. In all patients, at least one of these tests was positive.

It was shown that the circumoval precipitin reaction has no advantages over the

intradermal and complement fixation tests for the diagnosis of schistosomiasis mansoni. Actually, when intradermal and complement fixation tests are simultaneously performed, practically all individuals infected with *S. mansoni* are detected.

The use of a quantitative criterion for reading the circumoval test was considered very important. The value of the circumoval test for the assessment of cure in schistosomiasis mansoni was discussed.

#### REFERÊNCIAS

1. 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. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 9:600-603, 1960.
2. CANCIO, M.; DE SALA, A. R. & RODRIGUEZ-MOLINA, R. — Electrophoretic isolation of circumoval precipitins in the serum of individuals infected with *Schistosoma mansoni*. Exper. Parasitol. 8:549-556, 1959.
3. COKER, C. M. & OLIVER-GONZALEZ, J. — Experiments on anti-schistosome circumoval precipitating antibody in mice. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 7:390, 1957.
4. KAGAN, I. G. — Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. The Rice Institute Pamphlet 45:151-183, 1958.
5. KLOETZEL, K. — A reação de precipitação peri-ovular na esquistossomose. I. Investigações sobre a natureza da reação. Rev. brasil. Biol. 19:75-85, 1959.
6. KLOETZEL, K. — A reação de precipitação peri-ovular na esquistossomose. II. Correlação aos dados clínicos. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 1:129-137, 1959.
7. LEE, C. L. & LEWERT, R. M. — The distribution of various reactants in human anti-*Schistosoma mansoni* serums fractionated by starch electrophoresis. J. infect. Dis. 106:69-76, 1960.
8. NEWSOME, J. — Species-specific serological tests for bilharzia. Ann. trop. Med. & Parasitol. 52:82-86, 1958.
9. OLIVER-GONZALEZ, J. — Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. J. infect. Dis. 95:86-91, 1954.
10. OLIVER-GONZALEZ, J.; BAUMAN, P. M. & BENENSON, A. S. — Immunological aspects of infections with *Schistosoma mansoni*. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 4:443-452, 1955.
11. OLIVER-GONZALEZ, J.; BAUMAN, P. M. & BENENSON, A. S. — Species specificity of the anti-egg precipitin in schistosome serums. J. infect. Dis. 96:95-100, 1955.
12. OLIVER-GONZALEZ, J.; RAMOS, F. L. & COKER, C. M. — Serological reactions against egg antigens as an aid in the evaluation of therapy in schistosomiasis. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 4:908-912, 1955.
13. PELLEGRINO, J. — Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni. Métodos imunológicos. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. 11:507-551, 1959.
14. PELLEGRINO, J. & FREITAS, J. L. P. — Quantitative complement fixation test in schistosomiasis mansoni. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 10:537-540, 1961.
15. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — Novo critério de leitura da reação intradérmica na esquistossomose. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. 8:499-509, 1956.
16. PELLEGRINO, J.; REZENDE, C. L.; MEMORIA, J. M. P.; MOURÃO, O. G. & BRENER, Z. — Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni na criança. Journ. Pediatría 24:211-230, 1959.
17. RODRIGUEZ-MOLINA, R.; LICHTENBERG, F.; OLIVER-GONZALEZ, J. & DE SALA, A. R. — Studies on immunity to *Schistosoma mansoni*. II. The circumoval precipitin reaction to *S. mansoni* in mice treated with stibophen. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 8:565-569, 1959.
18. RODRIGUEZ-MOLINA, R.; OLIVER-GONZALEZ, J. & SERRANO, D. G. — Studies on immunity to bilharziasis mansoni: evaluation of the circumoval precipitin test. Bull. World Health Org. 18:1105-1107, 1958.
19. SENTERFIT, L. B. — Immobilization of the miracidia of *Schistosoma mansoni* by immune sera. II. The occurrence of the antibody during the course of schistosomiasis. Amer. J. Hyg. 68:148-155, 1958.

Recebido para publicação em 15 janeiro 1962.