

Comparação antigênica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus* — III imunoel troforese (IEF)*

Geraldo A. De Carli** & Jorge Guerrero***

Resumo

Antigenos preparados de *Tritrichomonas suis* e *T. foetus* foram separados pela eletroforese em gel e reagiram com os imuno-soros preparados em coelhos injetados com cada espécie de *Tritrichomonas*. As linhas de precipita o mais numerosas e mais fortes foram obtidas nas rea o es entre os antigenos e os imuno-soros homólogos. O estudo imunoel trofor tico trouxe resultados adicionais ao número de componentes antigênicos, mostrando a presença de pelo menos três grupos antigênicos específicos para a *T. foetus* e um para a *T. suis*. Os resultados obtidos puderam ser associados aos dados obtidos pela imunofluorescência indireta (IFI) e imunodifusão em gel (ID).

Summary

Antigenic comparison between Tritrichomonas suis and T. foetus — III Immunelectrophoresis (IEF)

Antigens prepared from *Tritrichomonas suis* and *T. foetus* were separated by gel immunelectrophoresis and reacted with the immune sera prepared from rabbits injected with gross antigens of each species of *Tritrichomonas*. The largest number and strongest precipitating lines were obtained in the reactions between antigens and their homologous immune sera. The immunelectrophoretic study produced additional information about the number of antigenic components showing the presence of at least three specific antigenic groups for *T. foetus* and one for *T. suis*. The results were related to data obtained by indirect immunofluorescence (IFI) and gel immunodiffusion.

Introdu o

A compara o antigênica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus* foi examinada pela imunofluorescência indireta (IFI) (2) e pela imunodifusão em gel (ID) (3). Os resultados obtidos indicaram a existência de antigenos comuns a ambas espécies com estrutura antigênica relacionada. Na presente investiga o foi estudada a rela o antigênica entre estes protozoários através da imunoel troforese (IEF).

Material e Métodos

Duas espécies de *Tritrichomonas* foram usadas neste estudo: *T. suis* (amostra TS-1), isolada da cavidade nasal de porcos domésticos, *Sus scrofa*, por De Carli & Guerrero (1) e *T. foetus* (amostra RJ-1), recebida do Dr. Avenir de Almeida Ramos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 47, Via C mpo Grande, Rio de Janeiro.

Os antigenos foram preparados, para cada organis-

mo, de acordo como foi previamente descrito (2). A concentra o de carboidratos totais, nitrogênio e proteínas existentes nos antigenos foi determinada pelo método da antrona de Fales (5) e modificado por Goodchild (6); pela técnica de Kjeldahl de 1833, modificada por Taveira & Bethelm (9) e pelo método de Folin-Ciocalteau, descrito por Lowry (7), respectivamente (2).

Os imuno-soros e o soro normal de coelho (SNC), preparados previamente (2), foram usados neste estudo. A técnica descrita por Williams (10), Rose & Bigazzi (8) e Dwyer (4) foi usada para separar as proteínas na superfície do ágar, de acordo com as cargas, das mesmas pela exposi o em um campo elétrico com corrente direta. O agente geleificante foi ágar purificado (BBL), na concentra o de 1,2% em soluço tampão de barbital com pH = 8,6, sem preservativo.

Lâminas de microscopia (128 x 75mm) foram preparadas pela adi o de 2,5ml de ágar purificado, liqu feito (50-60 C). Após a solidifica o do ágar   temperatura ambiente (22 C), as lâminas foram estocadas a 5 C em câmara úmida.

* Investiga o realizada com o auxílio financeiro da FAPERGS. Projeto Vet. 40/74.

** Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises. UFRGS, Porto Alegre, RS.

*** Instituto de Pesquisas Johnson & Johnson de Doenças End micas, São José dos Campos, SP e Faculdade de Medicina Veterinária, USP, S. Paulo. End. Atual: Pitman-Moore, Inc Washington Crossing, NJ 08560 USA.

Antes do uso, a superfície de agar de cada lâmina foi perfurada com a matriz escolhida. As lâminas preparadas, e com os orifícios cheios do antígeno desejado, foram submetidas a eletroforese, durante 90 minutos, usando-se seis miliampères (mA) por lâmina, a 22°C, em solução tampão de barbital com pH = 8,6 e força iônica 0,005. Terminada a migração, as canaletas das lâminas foram imediatamente cheias com os imunossoros. A reação processou-se em câmara úmida a 5°C; durante 72 horas. Em cada série de experimentos o imuno-soro específico reagiu contra os antígenos homólogos e heterólogos. As linhas de precipitação foram coradas e fotografadas, como foi descrito anteriormente (3). Todas as reações foram fotografadas depois de 72 horas de incubação (11).

Resultados e Discussão

Foram obtidos resultados negativos nas reações que envolveram o soro normal de coelho e os dois antígenos dos protozoários, ficando demonstrado que os coelhos utilizados não tinham tido anteriormente contato com estes antígenos. Não se formaram linhas de precipitação nas reações entre a solução tampão de barbital, os antígenos e os seis imuno-soros. A Tabela 1 mostra os resultados das reações de precipitação, obtidas através da IEF entre os imuno-soros e os antígenos de *Tritrichomonas*.

Tabela 1

Resultados das reações de precipitação, obtidas através da imuno-eletroforese entre anti-soros e antígenos de *Tritrichomonas*

Anti-soro	Antígeno	Nº de linhas formadas
ts	TS	1 a 2
	TF	1 a 7
tf	TS	1 a 2
	TF	3 a 6

ts, tf = anti-soros de *T. suis* e *T. foetus*

TS, TF = antígenos de *T. suis* e *T. foetus*

O sistema antígeno-imuno-soro homólogo da *T. foetus* apresentou três, quatro e seis linhas de precipitação (Fig. 1) e os sistemas antígeno-imuno-soro homólogo de *T. suis* mostraram uma e duas linhas (Fig. 2).

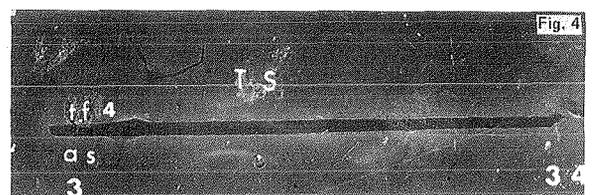
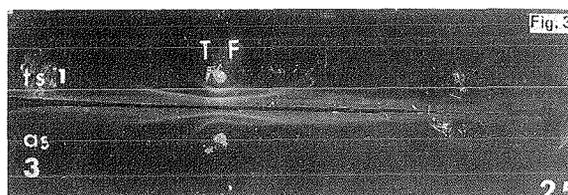
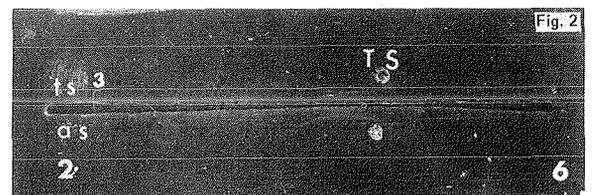
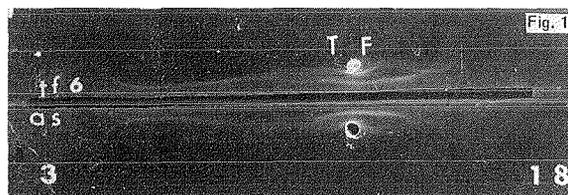
As combinações entre imuno-soro da *T. suis* (ts) e o antígeno *T. foetus* (TF) formaram uma, duas e sete linhas (Fig. 3) e o imuno-soro *T. foetus* (tf) e o antígeno *T. suis* (TS) revelaram uma e duas linhas de precipitação (Fig. 4).

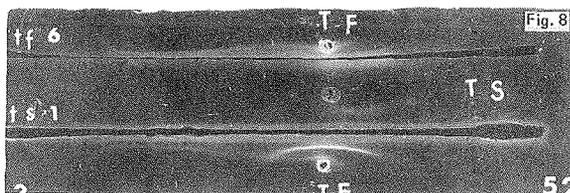
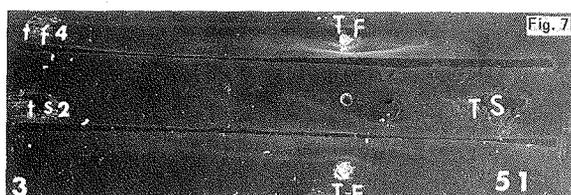
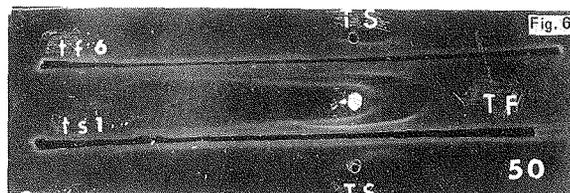
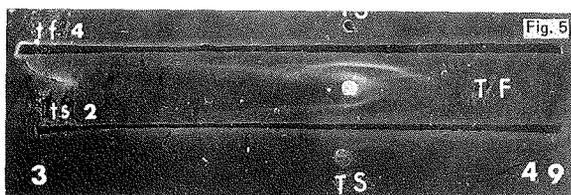
Os resultados previamente obtidos pela imunofluorescência indireta (IFI) (2) e pelo método da difusão em gel (ID) (3) indicaram que existe relação antigênica muito próxima entre *T. suis* e *T. foetus*. Acrescente-se a isso que a imunofluorescência indireta trouxe somente informações concernentes à existência de reações cruzadas entre as duas espécies. Entretanto, estes dados indicaram o número de antígenos comuns ou relacionados e responsáveis pelas várias reações cruzadas. Por outro lado, os resultados obtidos na imunodifusão em gel indicaram que as tricomonas de origem suína e bovina dividem entre si, no mínimo, antígenos idênticos com um número parcialmente relacionado.

Este estudo imuno-eletroforético trouxe resultados quantitativos adicionais ao número de componentes antigênicos. Os resultados obtidos pela imunofluorescência indireta (2) e pela imunodifusão em gel (3) mostraram resultados parcialmente semelhantes, evidenciando que as reações cruzadas entre os dois organismos refletem o número de antígenos comuns e relacionados.

Quando os antígenos TS e TF (Fig. 5, 6, 7, 8) foram comparados com os seus imuno-soros homólogos e heterólogos, observou-se que *T. foetus* reagiu com *T. suis*, formando quatro linhas de precipitação. Esta reação mostrou que *T. suis* deveria revelar também a presença destes determinantes antigênicos. Contudo, estes fatores poderiam não se encontrar no antígeno testado ou não estar em concentração adequada, ou então poderiam ter sido neutralizados durante a preparação ou estavam em quantidades insuficientes para reagir "in vitro".

A presença de anti-corpos contra os determinantes antigênicos de *T. foetus*, demonstrou porém que o anti-





geno TS injetado nos coelhos possui determinantes antigênicos semelhantes e que estão presentes na reação antígeno-anti-corpo. Entretanto, os resultados da imunodifusão em gel (ID) (3) puderem ser associados aos dados obtidos na imunoelctroforese (IEF), mostrando a formação de linhas de precipitação que indicaram a existência de antígenos comuns ou com uma estrutura relacionada.

T. foetus apresentou pelo menos três determinantes antigênicos que não estão presentes nas preparações antigênicas de *T. suis*.

T. suis apresentou dois determinantes antigênicos no sistema homólogo, com o imuno-soro contra *T. foetus*, uma destas linhas de precipitação também está presente, demonstrando que o coelho injetado com o antígeno TF reconheceu a presença de grupos antigênicos semelhantes àqueles presentes no antígeno TS. Conclui-se que este sistema é comum a *T. suis* e *T. foetus* mas, por motivos já explicados acima, esta reação não se apresentou no sistema TS homólogo.

Deve-se ressaltar que os antígenos responsáveis pela formação de numerosas linhas de precipitação de identidade, nos sistemas antígeno-anti-corpo nos testes de imunoelctroforese, aparentemente possuem, no míni-

mo, estrutura idêntica, como já foi visto nas provas de IFI (2) e ID (3). As linhas de identidade, obtidas na IEF, sugerem que os antígenos das duas espécies possuem estrutura parcialmente relacionada entre si. Entretanto, torna-se evidente que o grau de reações cruzadas entre os dois organismos, observadas pela IFI, ID e IEF, refletem o número comum e relativo de antígenos que eles partilham entre si, mas também indicam a existência de antígenos específicos para cada espécie.

A provável relação antigênica e filogenética comum entre as duas espécies, sugerida com o auxílio da imunofluorescência indireta e pela imunodifusão em gel, foram confirmadas pelos resultados deste estudo.

Agradecimentos

Agradecemos aos professores Edgar Mário Wagner e Elísia da Silva Wagner pelas sugestões e críticas na redação deste trabalho. Agradecemos também às acadêmicas Srtas. Maria Isabel D'Arrigo e Ana Teresa Jacinto Maia pela assistência na documentação fotográfica e a farmacêutica-bioquímica Zilma Freire e ao técnico de laboratório Sr. Eni Nunes pela preparação dos meios de cultura.

Referências Bibliográficas

- DE CARLI, G.A. & GUERRERO, J. — *Trichomonas suis*: Isolamento, morfologia e incidência na cavidade nasal de porcos domésticos *Sus scrofa*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 22:269-276, 1975.
- DE CARLI, G.A. & GUERRERO, J. — Comparação antigênica entre *Trichomonas suis* e *T. foetus*. I — Imunofluorescência indireta (IFI). *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 6:55-58, 1975.
- DE CARLI, G.A. & GUERRERO, J. — Antigenic Comparison between *Trichomonas suis* and *T. foetus*. II — Gel Immunodiffusion. *Rev. Lat-amerc. Microbiol.*, 18:167-171, 1976.
- DWYER, D.M. — Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. III — Immunoelectrophoresis techniques. *J. Protozool.*, 21:139-145, 1974.
- FALES, F.W. — The assimilation and degradation of carbohydrates by cells. *J. Biol. Chem.*, 193:113-124, 1951.
- GOODCHILD, C.C. — Carbohydrate contents of the tape worm *Hymenolepis diminuta* from normal, bileless and starved rats. *J. Parasit.*, 47:401-405, 1961.
- LOWRY, O.H. et alii — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- ROSE, N.R. & BIAGAZZI, P.E. — *Methods in immunodiagnosis*. New York, John Wiley & Sons, 1973, 212p.
- TAVEIRA, M. & BETHHELM, M.L. — Doseamento de proteínas. In: *Química bromatológica; métodos de análise de alimentos*. Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Brasil, 1957, fasc. 1, p. 75-80, mimeografado/.
- WILLIAMS, C.A. — Immunoelectrophoretic analysis in agar gels. In: WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W., ed. *Methods in immunochemistry*. New York, Academic Press, 1971, v. 3, cap. 14, p. 237-273.
- WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W. — Photography of precipitates in gels. In: *Methods in immunology and immunochemistry*. New York, Academic Press, 1971, v. 3, cap. 14, p. 321-339.