

A NEW SAND FLY IN THE SUBGENUS *NYSSOMYIA* (DIPTERA, PSYCHODIDAE)
FROM THE AMAZON BASIN OF BRAZIL

JORGE R. ARIAS, RUI A. DE FREITAS & TOBY V. BARRETT

Lutzomyia (*Nyssomyia*) *waltoni* n.sp., a new species of phlebotomine sand fly related to *L. ylephiletor*, *L. intermedia* and *L. hernandezi*, is described and illustrated. Available ecological observations are presented.

In the search for vectors of muco-cutaneous leishmaniasis in Ji-Paraná, Rondônia State, Brazil (Map 1), and area of active human colonization, we collected and examined several thousand sand flies. Of these, there were 25 *Nyssomyia* specimens which were different from all other known forms in this subgenus.

Lutzomyia (*Nyssomyia*) *waltoni* n.sp.
(Fig. 1, Map 1)

Measurements outside the brackets refer to the holotype and allotype respectively; within the brackets is the variation found in five paratypes. All measurements are in mm.

Male. Wing length 1.87 (1.75-2.04); width 0.43 (0.37-0.54). Entire insect faintly pigmented, the pleura hardly lighter than the nota. Head height from vertex to tip of clypeus 0.37 (0.35-0.40), width 0.28 (0.27-0.29). Eyes separated by 0.12 (0.12-0.12) or by a distance equal to 7.27 (7.32-7.60) facet diameters. Interocular suture present at sides. Flagellomere I, 0.22 (0.21-0.27); II + III, 0.22 (0.21-0.26); ascoids simple without a small posterior spur, present on all flagellomeres except last two; tips of those on II ending before the end of the flagellomere. Labrum 0.24 (0.24-0.27) long. Length of palpal segments; 1, 0.033 (0.033-0.044); 2, 0.115 (0.104-0.123); 3, 0.137 (0.120-0.158); 4, 0.076 (0.068-0.082); 5, 0.186 (0.175-0.229); palpal sensillae present on distal part of palp 2 and middle 1/3 of palp 3. Cibarium without dotlike remnants of teeth, cibarial arch complete, no pigment patch present. Pharynx unarmed. Thorax 0.42 (0.42-0.48) long. Pleura with 4 (4-9) upper and 1 (1-3) lower mesanepisternal setae. Length of wing vein sections: *alpha* 0.44 (0.39-0.57); *beta* 0.27 (0.22-0.30); *delta* 0.15 (0.07-0.23); *gamma* 0.16 (0.14-0.19). Length of femora, tibiae and basitarsi; foreleg, 0.73 (0.65-0.82), 1.14 (1.03-1.32), 0.76 (0.65-0.91); midleg, 0.66 (0.59-0.72), 1.26 (1.11-1.35), 0.79 (0.74-0.87); hindleg, 0.67 (0.67-0.78), 1.30 (1.30-1.59), 0.83 (0.83-0.98). **Genitalia:** style 0.11 (0.10-0.12) long with 4 major spines inserted on distal half of segment, the basal 2 inserted at approximately the same level; subterminal setae absent. Coxite 0.18 (0.16-0.19) long without persistent hairs. Paramere simple as shown, bearing small hairs on the distal 1/2 of dorsum. Aedeagus subtriangular with an acute tip, well pigmented. Genital pump 0.13 (0.12-0.14) long, each filament 0.31 (0.26-0.32) long or ca. 2.43 (2.18-2.60) X length of pump. Lateral lobe 0.18 (0.16-0.19) long. Cercus subtriangular as shown.

Female. Wing length 2.28 (2.14-2.38); width 0.66 (0.61-0.93). Pigmentation as for male. Head height and width not measured due to mounting (see discussion). Interocular suture as in male. Flagellomere I, 0.26 (0.24-0.27); II + III, 0.23 (0.22-0.24); ascoids as in male. Labrum 0.36 (0.34-0.43) long. Length of palpal segments: 1, 0.060 (0.044-0.052); 2, 0.186 (0.177-0.224); 3, 0.191 (0.175-0.207); 4, 0.087 (0.087-0.109); 5, 0.273 (0.262-0.284). Palpal sensillae in middle 1/3 of segments 2 and 3. Cibarium with 8 (8-10) horizontal teeth and 4 to 5 rows of ca. 20 vertical teeth each below horizontal teeth, cibarial arch complete or nearly so, pigment patch present as shown. Pharynx unarmed. Thorax 0.58 (0.55-0.57) long. Pleura with 10 (6-9) upper and 4-5 (1-2) lower mesanepisternal setae. Length of wing vein sections: *alpha* 0.63 (0.52-0.63); *beta* 0.28 (0.28-0.33); *delta* 0.26 (0.16-0.27); *gamma* 0.18 (0.22-0.24). Length of femora, tibiae and basitarsi: foreleg 0.90 (0.85-0.95); 1.31 (1.19-1.31), 0.90 (0.82-0.88); midleg 0.79 (0.78-0.85), 1.38 (1.29-1.39), 0.95 (0.85-0.92); hindleg 0.86 (0.82-0.85), 1.53 (1.45-1.50), 0.99 (0.90-0.95). **Genitalia:** spermatheca annular with 6 (6-7) annuli, the last slightly larger than the others and bearing a terminal knob (or "head"). Individual spermathecal ducts 0.12 (0.10-0.11) long, distinct. Common spermathecal duct 0.049 (0.035-0.045) long, distinct. Cercus subtriangular as shown.

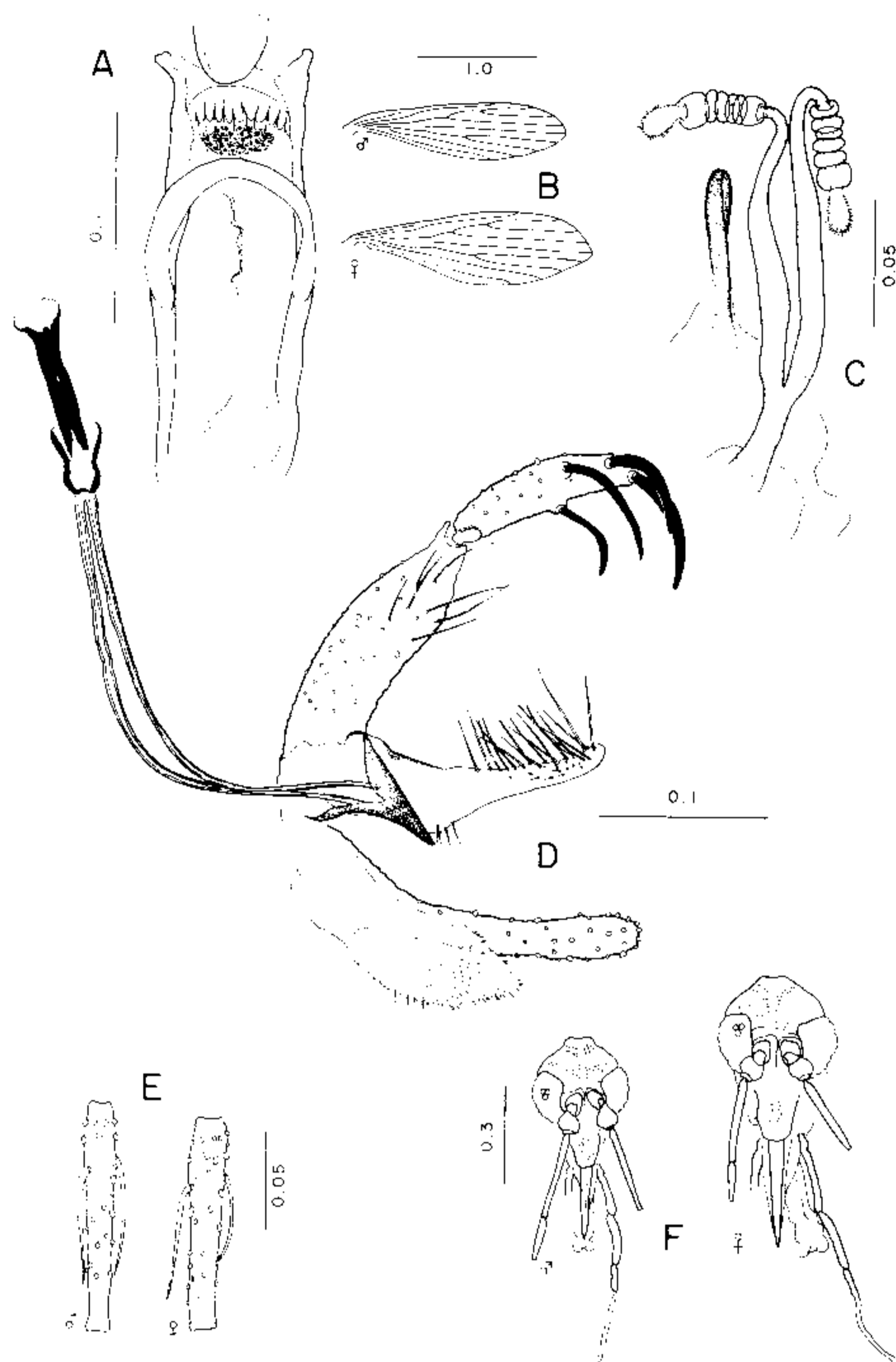


Fig. 1: *Lutzomyia waltoni* – a: female cibarium; b: wings; c: spermathecae; d: male genitalia; e: flagellomeres; f: heads.

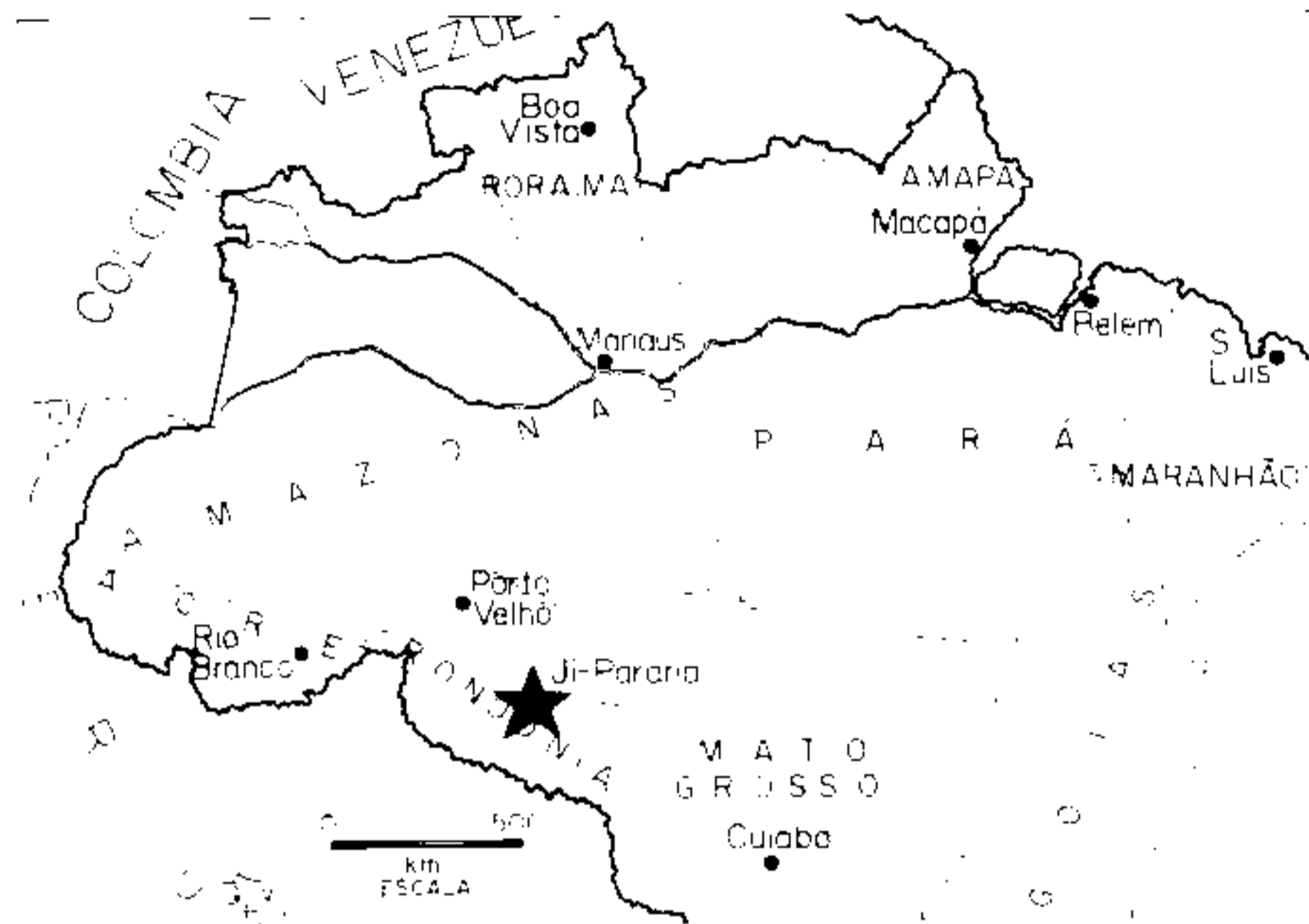
DISCUSSION

Lutzomyia waltoni was taken resting on tree bases from an area 12.7 km south of the city of Ji-Paraná (from the bridge over the Rio Urupá) (11°03'S., 62°00'W.) Rondônia State, Brazil on the 12-24/Feb./1983. One male was taken on the 09/Mar./83 near the town of Ouro Preto do Oeste, Rondônia State, in a CDC miniature light trap set one meter above the forest floor. All material was collected by T.V. Barrett, J.F. Vidal and F.L. Santos. Although a single female was taken biting man during a day-time tree base collection, there were no other indications that this is an anthropophilic species. All the females taken were dissected and examined for flagellates and found to be negative.

The males of this species appear to be close to *L. ylephiletor* (Fchld. & Htg.), *L. intermedia* (Lutz & Neiva) and *L. hernandezi* (Ortiz), while the females are distinct from all others in the subgenus. The long 5th palpal segment in both sexes readily separates *L. waltoni* from all other species in the subgenus *Nyssomyia* Barretto, 1962. In addition, the males differ from *L. ylephiletor* by the position of the terminal spines on the style which are almost paired in *L. ylephiletor*, the sperm duct/pump ratio, as well as other measurements. The females have spermathecae similar to those of *L. ylephiletor* and *L. trapidoi* (Fchld. & Htg.), but can be readily differentiated by the presence of a common spermathecal duct in *L. waltoni*, which is present but much smaller in *L. ylephiletor*.

Male, holotype, Brazil, Rondônia, 12.7km S of Ji-Paraná (at 10°03'S. 62°00'W.) resting on tree base, 24/Feb./1983, T.V. Barrett, J.F. Vidal & F.L. Santos colls. Female allotype same information except collected on 12/Feb./1983 (dissection no. 91). 11 male and 6 female paratypes same information as holotype, females with different dissection numbers; 3 female paratypes, same information except collected on 12/

Feb./1983; 2 female paratypes, same information but collected on 25/Feb./1983; one male paratype, same information except collected near the town of Ouro Preto do Oeste in a CDC light trap set 1 meter above the forest floor on the 09/Mar./1983.



Map 1: location of Ji-Paraná, Rondônia State, Brazil. Type locality of *Lutzomyia waltoni*.

Material examined: 13 males, 12 females from Rondônia State, Brazil as cited above as type material.

This species is named in honor of our good friend Dr. Bryce C. Walton for his many years of work in leishmaniasis.

RESUMO

Lutzomyia (Nyssomyia) waltoni n.sp., uma nova espécie de flebótomo é descrita e ilustrada. Observações ecológicas disponíveis são apresentadas.

ANTICORPOS ANTI-HBs OBTIDOS EM COELHOS E SUA UTILIZAÇÃO COMO REAGENTES PARA TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA HEPATITE B

C.F.T. YOSHIDA*, L.A.C. MERCADANTE*, A.M.C. GASPAR*, M.M.S. MAIA**,
O.J. BERRO**, E.C.C. DE ALMEIDA** & H.G. SCHATZMAYR*

Pela técnica de cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina de Sepharose 4B ligada ao anti-HBs, obteve-se na passagem de plasma de portador assintomático de antígeno HBs, um antígeno parcialmente purificado. Este antígeno foi utilizado para a inoculação em coelhos, num esquema de cinco doses, sendo a primeira dose de 1 mg e as quatro subseqüentes de 0,5 mg, com intervalos aproximadamente de quinze dias. Observando-se que os títulos não mais variaram após a quinta inoculação, os animais foram sangrados no 62º dia e os anticorpos anti-HBs obtidos foram padronizados através dos seguintes métodos para detecção de antígeno HBs:

a) Hemaglutinação passiva reversa (HAPR) – utilizando-se a gamaglobulina específica obtida de soro imune dos coelhos através de cromatografia de afinidade, alcançando uma concentração ótima de apenas 10 µg/ml para a sensibilização de hemácias de carneiro a 5%, fixadas com glutaraldeído.

b) Contraímunoeletroforese (CIEF) – utilizando-se o soro imune diluído até 1/20 como reagente para a detecção do antígeno HBs.

O soro imune anti-HBs foi também utilizado para a conjugação com uma nova resina de Sepharose 4B tendo uma captação aproximada de 0,5 a 1,0 mg de antígeno HBs por ml de resina após completa saturação.

A hepatite causada pelo vírus B, constitui um problema de saúde pública, particularmente preocupante em todo mundo, devido à alta incidência de infecções crônicas.

Estima-se que cerca de 2% dos indivíduos na nossa população dos grandes centros são portadores assintomáticos deste vírus (Pereira & Callado, 1972; Yoshida et al., 1979; Mazzur et al., 1980) havendo registro da presença alarmante nas regiões do Norte do país (Bensabath & Boshell, 1973).

Como medida primária na prevenção da propagação do vírus através do sangue infectado, sentiu-se a necessidade de estudar a purificação do antígeno HBs por vários métodos entre eles a de cromatografia de afinidade (Takahashi et al., 1974; Houwen, Goundeau & Dankert, 1975) e centrifugações em gradientes de densidade (Gerin, Holland & Purcell, 1971; Bond & Hall, 1972). Posteriormente trabalhou-se na padronização de reagentes para o diagnóstico sorológico e detecção principalmente do antígeno de superfície em indivíduos doadores de banco de sangue.

As técnicas utilizadas para determinação do antígeno HBs são várias, desde as menos sensíveis como a imunodifusão (ID) (Blumberg, 1965; Prince, 1968), seguindo-se a fixação de complemento (FC) (Purcell et al., 1969; Shulman & Barker, 1969) e contraímunoeletroforese (CIEF) (Gocke & Howe, 1970), hemaglutinação passiva reversa (HAPR) (Juji & Yokochi, 1969; Vyas & Shulman, 1970), radioimunoensaio (RIE) (Walsh, Yalow & Berson, 1970; Lander, Alter & Purcell, 1971) e mais recentemente os ensaios imunoenzimáticos, sendo estes três últimos, considerados testes de terceira geração.

Neste último grupo, o RIE tem uma alta sensibilidade, mas torna-se pouco prático em nosso meio, devido ao seu alto custo associado com a necessidade de equipamentos especiais. Avanços em ensaios imunoenzimáticos estão sendo realizados e por ora utilizamos o teste de HAPR, que apresenta uma alta sensibilidade, é de fácil preparo e execução, além do custo bem inferior em relação ao RIE.

O presente trabalho tem como finalidade demonstrar, em nosso meio, uma técnica de purificação de antígeno HBs fácil e reprodutiva que nos permita obter anticorpos específicos após inoculação em coelhos e que esses possam ser aplicados em técnicas de diagnóstico para detecção de antígeno HBs por HAPR

* Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Virologia, Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

** Bio-Manguinhos – FIOCRUZ, Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido para publicação em 28 de outubro e aceito em 1º de dezembro de 1983.

e CIEF tanto de doadores de sangue como em pacientes portadores de hepatite. A sensibilização das hemácias de carneiro para o teste de HAPR foram feitas nos laboratórios de produção de reagentes para diagnóstico de hepatite B – Bio-Manguinhos – FIOCRUZ.

MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de antígeno: plasma de portadores assintomáticos de antígeno HBs foram gentilmente enviados pelo Instituto Estadual de Hematologia Artur Siqueira Cavalcante e pelo Banco de Sangue da Santa Casa da Misericórdia (Rio de Janeiro). Após serem titulados pela técnica de HAPR, os plasmas com título de 1/1024 foram agrupados obtendo-se um volume final de 950 ml.

Purificação do antígeno HBs por coluna de cromatografia de afinidade ligada ao anti-HBs: soro de coelho anti-HBs com título de 1/32 em CIEF foi conjugado à resina de Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.) de acordo com o método de Porath, Axen & Einbach (1967). Numa coluna de 2,6 x 30cm foram colocados 155ml desta resina e sobre esta foram aplicados 950ml de plasma contendo antígeno HBs. Após a lavagem extensiva da resina com tampão Tris-HCl (0,01M, pH 7,5) contendo 0,1M de NaCl e 10mM de EDTA, passou-se o equivalente a um volume de resina de MgCl₂ 1M para a retirada de ligações inespecíficas e posteriormente dois volumes de MgCl₂ 4M. Foram colhidas alíquotas de 20ml e as que apresentaram maior atividade específica de HBsAg foram agrupadas, dialisadas com tampão Tris-HCl salina e concentradas para 4,5ml por filtração em pressão negativa.

Esquema de inoculação em coelhos: foram utilizados dez coelhos brancos, jovens, pesando cerca de 2kg cada, provenientes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz. Antes de se iniciar o esquema de inoculação, todos os coelhos foram testados para certificar a ausência de anticorpos anti-HBs.

Para cada coelho foi utilizado o seguinte esquema de inoculação:

1ª dose (dia 0) – 1mg de antígeno HBs/ml, V/V com adjuvante de Freund completo, por via intramuscular na parte interna de ambas as coxas.

2ª dose (dia 14) – 0,5mg do mesmo antígeno/ml, V/V com adjuvante de Freund completo, via subcutânea em 2 pontos na região ventral.

3ª dose (dia 26) – 0,5mg do mesmo antígeno/ml, V/V com adjuvante de Freund completo, via subcutânea em 2 pontos na região dorsal.

4ª dose (dia 42) – semelhante à 2ª dose.

5ª dose (dia 57) – semelhante à 3ª dose.

Para o acompanhamento da elevação do título de anti-HBs, os coelhos foram periodicamente sangrados para prova e as amostras foram testadas por hemaglutinação passiva (HAP – hemácia de carneiro ligada ao antígeno HBs, Bio-Manguinhos – FIOCRUZ). Após 62 dias a partir da primeira inoculação, os animais foram sangrados por punção cardíaca obtendo-se um total de 320ml de soro.

A presença de contaminantes de anti-soro humano foi demonstrada utilizando-se hemácias de carneiro ligadas com soro humano normal. A retirada destes contaminantes se fez pela passagem do soro em 30ml de resina de Sepharose 4B conjugada ao soro humano.

Sensibilização da hemácia de carneiro para o teste de HAPR: 190ml de soro imune foram passados numa coluna de cromatografia de afinidade em Sepharose 4B ligada ao antígeno HBs, da mesma forma como descrita anteriormente para a obtenção do antígeno. As frações de maior atividade específica de anti-HBs foram agrupadas e depois concentradas para 5,5ml.

A sensibilização das hemácias foi feita de maneira semelhante à técnica descrita por Imai et al., 1974. Hemácias de carneiro fixadas com glutaraldeído numa concentração final de 0,3% foram ativadas com ácido tânico em diferentes concentrações (1,25 mg% a 5 mg%) e incubadas com anticorpo anti-HBs em concentrações de 5µg a 100µg/ml. As hemácias foram testadas após um dia e posteriormente até completa estabilização no sétimo dia frente a um painel de referência (PR - Bio-Manguinhos - FIOCRUZ) e titulados frente a um antígeno HBs de alta pureza (100µg/ml) gentilmente cedido por Imai, M. da Jichi Medical School, Japão.

Preparo de soro imune como reagente para CIEF: para a técnica de contraímunoeletroforese o soro imune foi diluído a 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40 e colocados frente ao mesmo painel de referências para antígeno HBs utilizado em HAPR.

Ativação e conjugação do soro imune anti-HBs à resina de Sepharose 4B: a ativação da Sepharose 4B foi feita baseando-se na técnica descrita por Porath, Axen & Einbach (1967) e Cuatrecasas (1970). Para a conjugação de 100 ml de soro imune foram ativados 100 ml de Sepharose 4B com BrCN a 0,5% num volume equivalente a 200 ml. Durante a ativação, o pH da solução foi rapidamente acertado para 11, pela adição

de NaOH. Após isso, a Sepharose foi lavada dez vezes em tampão bicarbonato gelado 0,1 M (0-4°C) num funil Buchner e a seguir foi feita a ligação com a proteína. Para tanto, diluiu-se o soro de coelho anti-HBs V/V com tampão bicarbonato e juntou-se à Sepharose ativada, incubando-se por um período de duas horas a 4°C. Em seguida, a Sepharose foi lavada cinco vezes com tampão bicarbonato para a retirada do excesso de soro. O tampão etanolamina 0,5 M pH 8,0 foi adicionado à resina para bloquear os possíveis sítios ativos, após o que foram feitas lavagens sucessivas e alternadas com tampão borato 0,1 M pH 8,0 e tampão acetato 0,1 M pH 4,0. A lavagem final foi feita em tampão Tris-HCl pH 8,0 no qual a Sepharose foi ressuspensa no volume original.

RESULTADO

Purificação de antígeno HBs: pela passagem de 950 ml de plasma contendo antígeno HBs de título 1/1024 em HAPR, em coluna de cromatografia de Sepharose 4B ligada ao anti-HBs, obtivemos como resultado os dados do Gráfico I.

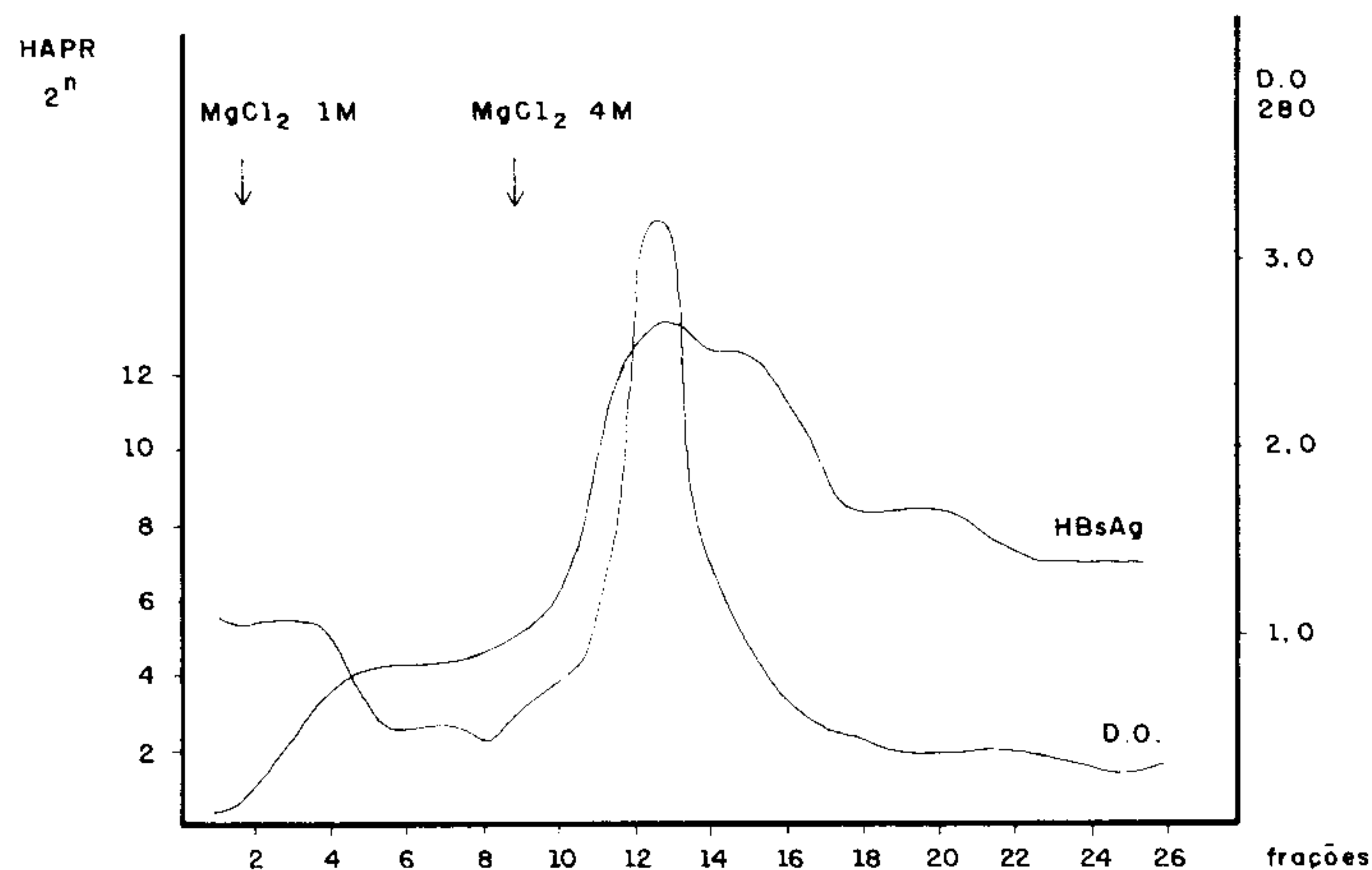


Gráfico I: purificação de HBsAg por cromatografia em Sepharose 4B anti-Hbs.

As alíquotas de 11 a 16 foram misturadas, dialisadas e concentradas por ultrafiltração em pressão negativa até um volume de 4,5 ml. A este antígeno, denominou-se lote I.

O lote I foi titulado por HAPR e medida a densidade óptica a 280nm. A concentração proteica (mg/ml) foi calculada segundo Vyas et al. (1972), baseada na lei de Lambert-Beer, onde $D.O. = KCL$, sendo $L = 1$ cm e coeficientes de extinção de uma solução a 1% considerando igual a 30.

As atividades total e específica estão demonstradas na Tabela I.

TABELA I

Obtenção do antígeno HBs por cromatografia de afinidade

	Vol (ml)	HAPR título	D.O. 280 nm	mg/ml	Atividade total $\times 10^{-3}$	Atividade específica
Plasma inicial	950	1/1024	62,5	20,8	972,8	16,4
Lote I Fr 11-16	4,5	1/64000	30,1	10,0	288,0	2126,2

Obtenção de anticorpos anti-HBs em coelhos: o Gráfico II mostra a elevação gradual da média geométrica dos títulos obtidos nos soros imunes dos animais inoculados. Entre uma e outra inoculação foram feitas duas sangrias de prova e titulados em PHA. Após a quarta inoculação, verificou-se que não houve elevação apreciável do título destes soros e no 62º dia os animais foram sangrados por punção cardíaca.

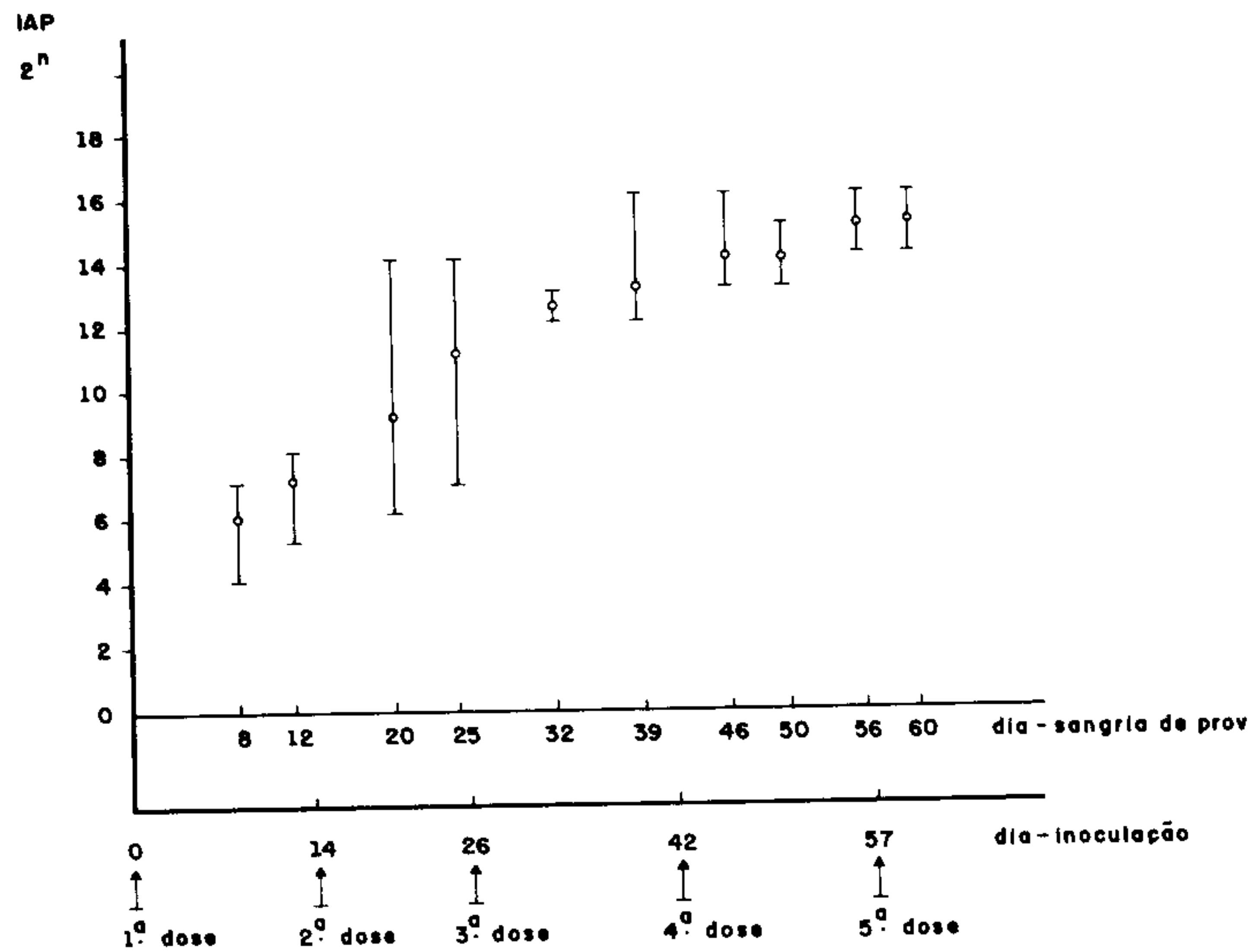


Gráfico II: média geométrica dos títulos de anti-HBs obtidos em coelhos.

Conforme se observa no Gráfico, após a primeira inoculação, obtivemos um título médio de 1/128 por hemaglutinação passiva, após a segunda inoculação o título subiu a 1/2048, após a terceira inoculação alcançamos o título de 1/8000. Apesar da quarta inoculação chegar ao título médio de 1/16000 e na quinta inoculação a 1/32000, a partir da terceira inoculação, encontramos coelhos cujos títulos individuais alcançam 1/64000 mostrando que a partir do 40º dia, aproximadamente, podemos obter uma resposta máxima dependendo da reatividade individual dos animais.

Durante o trabalho tivemos a perda de dois animais e o volume do soro imune obtido foi de 320ml cujo título foi de 1/32000 em hemaglutinação passiva. Os contaminantes de anti-soro humano apresentaram título de 1/8000 e foram eliminados em cromatografia com Sepharose 4B ligada ao soro humano normal.

Deste total, 190ml foram processados para a obtenção de gamaglobulina para sensibilização de hemácias de carneiro e 100ml foram utilizados para a conjugação de nova resina de Sepharose 4B. O restante foi utilizado como reagente para a técnica de contraímunoelctroforese.

Preparação de gamaglobulina específica para sensibilização de hemácias de carneiro a 5%: após passagem de 190ml de soro imune pela coluna de cromatografia, foram reunidas as frações de maior atividade obtendo-se a gamaglobulina denominada gama 002 que após diálise e concentração apresentou o resultado apresentado na Tabela II.

TABELA II

Obtenção de gamaglobulina anti-HBs por cromatografia de afinidade

	Vol (ml)	HAP título	D.O. 280 nm	Atividade total x 10 ⁻³	Atividade específica
Soro anti-HBs	190	1/32000	62,8	6080,0	509,5
Gama glob. 002	5,4	1/32000	13,8	172,8	2318,8

Esta gamaglobulina utilizada para a sensibilização de hemácias apresentou melhores resultados na preparação com ácido tânico a 1,25mg% e numa concentração de 10µg/ml.

Preparo de reagente para CIEF: a diluição mais alta do soro imune encontrada para a detecção da concentração mínima de antígeno foi de 1/20.

Especificidade e sensibilidade dos reagentes: a especificidade e sensibilidade das hemácias de HAPR foi calculada com base nos testes bioestatísticos descritos por Yerushalmy, J. (in Feinstein, 1977).

Sobre um painel PR-Bio-Manguinhos composto de 100 amostras, tomou-se como condição confirmada, os resultados positivos e negativos para RIE e comparou-os com os resultados obtidos em HAPR, calculando-se a sua especificidade e sensibilidade. A Tabela III mostra os resultados obtidos por RIE e HAPR no painel PR-Bio-Manguinhos.

TABELA III
 Comparação da Técnica R-PHA e RIE utilizando o Painel de Referência PR-Bio-Manguinhos

Teste em Análise	Condições confirmadas	
	RIE +	RIE -
HAPR +	A Positivo Verdadeiro 64	B Positivo Falso 0
HAPR -	C Negativo Falso 9	D Negativo Verdadeiro 27

A especificidade calculada por $\frac{D}{B + D} \times 100$, foi de 100% entre a reação de RIE e HAPR e a sensibilidade $\frac{A}{A + C} \times 100$ calculada foi igual a 87,6% em relação ao RIE.

As sensibilidades das técnicas de HAPR e CIEF foram comparadas quando tituladas frente a um antígeno de alta pureza de 100 µg/ml de HBsAg, cujo resultado está na Tabela IV.

TABELA IV
 Captação de antígeno HBs pelas técnicas de HAPR e CIEF

HBsAg 100 µg/ml	HAPR	CIEF
Título 2 ⁿ	2 ¹²	2 ⁴
Captação mínima µg/ml	0,024	12,5

Conjugação do soro imune à resina de Sepharose 4B: após ativação da Sepharose 4B e conjugação com 100ml de soro imune diluído a 1/2, este volume foi recolhido e analisado, cujo resultado está na Tabela V.

TABELA V
 Conjugação do soro imune à resina de Sepharose 4B

Conjugação	Vol. (ml)	D.O. 280nm	HAP	Atividade total x 10 ⁻³
Antes	100	45,5	1/32000	3200
Após	200	1,30	1/2048	409,6

Pelo resultado da atividade total do soro após a conjugação, observamos que houve perda de 16% e conseqüentemente ligação de 84% do soro original à resina.

A posterior utilização desta resina até completa saturação demonstrou uma capacidade de 0,8 mg/ml de resina e a reutilização da mesma manteve semelhante grau de captação.

DISCUSSÃO

A utilização de soros imunes específicos obtidos em animais tem sido um recurso largamente empregado na sorologia para a detecção do antígeno de superfície (antígeno HBs) do vírus da hepatite B.

Apesar de se encontrar cerca de 10 a 20% de anticorpos anti-HBs, mais precisamente na população de doadores de banco de sangue no nosso meio (Yoshida et al., a ser publicado) estes anticorpos são geralmente de baixo título tornando-se inadequados como reagentes para diagnóstico.

Por outro lado, o antígeno HBs encontra o seu grande reservatório no homem, sendo o plasma dos indivíduos infectados a grande fonte para obtenção deste antígeno através de purificações, seja ela para o preparo de vacinas como o preparo de reativos.

A purificação em cromatografia de afinidade tem sido utilizada por Takahashi et al. (1974), Houwen, Goundeau & Dankert (1975). A técnica tem a vantagem de não necessitar de equipamentos sofisticados, entretanto o produto final apresenta pequenas quantidades de contaminantes de soro humano.

O rendimento do antígeno HBs em nossa técnica foi bastante satisfatório obtendo-se um produto final cuja atividade específica alcançou nível cerca de 132 vezes maior no lote 1 quando comparado ao plasma inicial.

A escolha de coelhos para a inoculação do antígeno se deveu ao fato destes animais responderem com títulos elevados de anticorpos (Melartin & Blumberg, 1966; Das, Cash & Cumming, 1971), por serem animais de fácil obtenção e manuseio e com um volume de sangria suficiente para o objetivo deste estudo.

A inoculação do antígeno do lote I utilizou cerca de 2,5 a 3,0 mg totais de proteína por coelho, obtendo uma boa resposta, como se verificou a partir da terceira inoculação em alguns dos animais. Entretanto, dependendo da reatividade individual de cada animal, sugere-se a dose de reforço a fim de verificar o aumento do título de anticorpo. É descrito por vários autores, entre eles Dreesman et al. (1975), que antígenos purificados através de ultracentrifugação em gradientes de sacarose e cloreto de cézio, sob forma de polipeptídeos, requerem quantidades bem menores de antígeno, visto o alto grau de pureza do mesmo. Entretanto a resposta à contaminação de soro humano presente ao antígeno no nosso trabalho foi facilmente removida por uma simples cromatografia e não interferiu na finalidade de sua utilização.

Para a técnica de CIEF, encontrou-se o soro reagindo até a uma diluição de vinte vezes, mostrando a grande quantidade que se obtém como reativo.

Já o preparo da gamaglobulina utilizada para o teste de hemaglutinação mostrou uma alta reatividade, sendo que apenas 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ foram suficientes para a sensibilização de hemácias de camelo a 5%.

Pelos resultados obtidos pelo PR-Bio-Manguinhos podemos observar a alta especificidade do teste de hemaglutinação e a sensibilidade próxima a 90% quando comparado ao teste de radioimunoensaio.

A positividade da reação de hemaglutinação mostrou que a técnica permite a captação mínima de 0,024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antígeno e a técnica da CIEF de 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concluindo-se assim que a hemaglutinação chega a ser 250 a 500 vezes mais sensível que a CIEF. Resultados semelhantes foram observados por Kimura et al. (1978).

Finalmente, a técnica de CIEF é utilizada em laboratórios de menores recursos para o diagnóstico sorológico da hepatite B e nos laboratórios de pesquisa, esta reação é largamente empregada para a seleção e controle de reativos.

Considerando a alta especificidade e sensibilidade da HAPR como teste de terceira geração, esta reação é largamente utilizada no Japão e na França como controle do vírus da hepatite B nos bancos de sangue.

Atualmente, o setor de produção de reagentes para diagnóstico de Bio-Manguinhos vem utilizando esta técnica para o preparo de hemácias sensibilizadas com anticorpo tendo encontrado resultados reprodutíveis em doze lotes sucessivos.

SUMMARY

By the method of affinity chromatography a partially purified antigen was obtained after passing the plasma of an asymptomatic carrier of HBsAg through a column of Sepharose 4B linked to anti-HBs. This antigen was inoculated in rabbits using a schedule of 1,0 mg in the first dose and 4 other doses of 0,5 mg with intervals of approximately 15 days. Observing that blood samples collected after the 5th inoculation showed no change in antibody levels, the animals were bled on the 62th day and these immune sera were standardized with the following tests for the detection of HBsAg:

a) Reverse passive hemagglutination (R-PHA) – using specific gamma globulin that was obtained from rabbit sera by affinity chromatography and reaching an optimal concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to sensitise SRBC at 5% fixed in glutaraldehyde.

b) Counter immuno electrophoresis (CIEP) – using the rabbit immune sera diluted to 1/20 as a reagent for the detection of HBsAg.

The immune sera was also used to conjugate new Sepharose 4B for affinity chromatography and was found having a linking capacity of approximately 0,5 to 1,0 mg of HBsAg per ml of Sepharose after complete saturation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENSABATH, G. & BOSHELL, J., 1973. Presença de antígeno "Australia" (au) em populações do interior do estado do Amazonas, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. (São Paulo)*, 15 :284-288.
- BLUMBERG, B.S., 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *J. Amer. Med. Ass.* 191 :541-546.
- BOND, H.G. & HALL, W.T., 1972. Separation and purification of hepatitis associated antigen into morphologic type by zonal ultracentrifugation. *J. Infect. Dis.* 125 (3) :263-268.
- CUATRECASAS, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. *The J. of Biol. Chem.*, 245 :3059-3065.
- DAS, P.C.; CASH, J.D. & CUMMING, R.A., 1971. A method for production of antibody to hepatitis associated antigens in rabbits. *Brit. J. of Haematology* 20 (4) :363-367.
- DREESMAN, G.R.; CHAIREZ, R.; SUAREZ, M.; HOLLINGER, F.B.; COURTNEY, R.J. & MELNICK, J.L., 1975. Production of antibody to individual polypeptides derived from purified hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* 16 (3) :508-515.
- FEINSTEIN, A.R., 1977. Clinical Biostatistics. *The C.V. Morby Company. Saint Louis, Chapter 15* :214-226.
- GERIN, J.L.; HOLLAND, P.V. & PURCELL, R.H., 1971. Australia antigen: large scale purification from human serum and biochemical studies of its protein. *J. Virol.* 7 (5) :569-576.
- GOCKE, D.J. & HOME, C., 1970. Rapid detection of Australia antigen by counter immunoelectrophoresis. *J. Immunol.* 104 :1031-1032.
- HOUWEN, B.; GOUNDEAU, A. & DANKERT, J., 1975. Isolation of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by affinity chromatography on antibody coated immunosorbents. *J. Immunol. Methods* 8 :189-195.
- IMAI, M.; YAMASHITA, Y.; MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M., 1974. Haemagglutination inhibition assays of the common determinants and subspecificities of Australia Antigen. *Immunol.* 27 :871-878.
- KIMURA, R.T.; TACHIBANA, C.F.; CURY, V.L. & TAKEDA, A.K., 1978. Reações imunológicas para a detecção do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 38 (2) :83-86.
- JUJI, T. & YOKOCHI, T., 1969. Haemagglutination technique with erythrocyte coated with specific antibody for detection of Australia antigen. *Jap. J. Exp. Med.* 39 :615-620.
- LANDER, J.J.; ALTER, H.J. & PURCELL, R.H., 1971. Frequency of antibody to hepatitis – associated antigen as measured by a new radioimmunoassay technique. *J. Immunol.* 106 :1066-1171.
- MAZZUR, S.; NATH, N.; FANG, C.; BASTIAANS, M.J.; MOLINARIS, J.L.; BALCASER, M.; BEKER, G.S.; BRUNIGS, E.A.; CAMERON, A.R.E.; FARREL, V.; FAY, O.H.; LABRADOR-GONZÁLEZ, G.; GONZÁLEZ, L.C.; GUTIÉRREZ, D.A.; JARAMILLO, T.C.; KATZ, R.; LEME LÓPEZ, M.B.; LERY-KOENIG, E.; MORALES AYALA, F.; RODRIGUES AMAYA, J.; RODRÍGUEZ-MOYADO, H.; TORRES, R.H. & VELASCO, M., 1980. Distribucion de marcadores de virus de hepatitis B (VHB) en la sangre de donadores de 13 países del hemisferio occidental: Actas del Taller Latinoamericano de la Cruz Roja sobre Hepatitis B. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 89 (3) :239-247.
- MELARTIN, L. & BLUMBERG, B.S., 1966. Production of antibody against "Australia Antigen" in rabbits. *Nature* 210 :1340-1341.
- PEREIRA, J.M. & CALLADO, A.N.A., 1972. Antígeno Australia pesquisa em doadores de sangue do Estado da Guanabara. *Inst. Est. Hematol. Arthur de Siqueira Cavalcanti (Rio de Janeiro)*, 2 :5-29.
- PORATH, J.; AXEN, R. & EINBACH, S., 1967. Chemical Coupling of Protein to agarose. *Nature* 215 :1491-1492.
- PRINCE, A.M., 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 60 :814-821.
- PURCELL, R.H.; HOLLAND, P.V.; WALSH, J.H.; WONG, D.C.; MORROW, A.G. & CHANOCK, R.M., 1969. A complement fixation test for measuring Australia antigen and antibody. *J. Infect. Dis.* 120 :383-386.
- SHULMAN, N.R. & BARKER, L.F., 1969. Virus-like antigen, antibody and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation. *Science* 165 :304-306.
- TAKAHASHI, K.; IMAI, M.; OZAWA, N. & MAYUMI, M., 1974. Hepatitis B Antigen, Isolation and Purification. *Nippon Rinsho* 32 :16-24.
- VYAS, R.N. & SHULMAN, N.R., 1970. Haemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis. *Science* 170 :332-333.

- VYAS, G.G.B.; WILLIAMS, E.W.; KLAUS, G.C.B. & BOND, H.E., 1972. Hepatitis-Associated Australia antigen. Protein, Peptides and Amminoacid composition of purified antigen and its use in determining sensitivity of the haemagglutination test. *J. Immunol.* 108 (4) :1114-1118.
- WALSH, J.H.; YALOWR & BERSON, S.A., 1970. Detection of Australia Antigen and antibody by means of radioimmunoassay technique. *J. Infect. Dis.* 121 :550-554.
- YOSHIDA, C.F.T.; GASPAR, A.M.C.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHATZMAYR, H.G., 1979. HBsAg, Subtypes and HBsAb in white and asiatic population from urban and rural communities in the south of Brazil. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 10 (3) :106-110.
- YOSHIDA, C.F.T.; NOGUEIRA, R.M.R.; MERCADANTE, L.A.C.; PINHÃO, A.T. & SCHATZMAYR, H.G. Seroepidemiological survey of Hepatitis B, Hepatitis A, cytomegalovirus and Herpesvirus type 2 in prime blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. (*a ser publicado*).