

INCERCĂRI DE AMELIORARE A UNUI EXTRACT ANTIGENIC LIOFILIZAT DIN ASCARIS SUUM (GOEZE, 1782)

— Notă preliminară —

dr. M. Bornuz, dr. Mariana Deac, dr. Afrodita Literat, Aurelia Buda,
Mia Milea

În februarie 1962, la Simpozionul de parazitologie organizat de filiala U.S.S.M. Tîrgu Mureș, unii din noi, împreună cu dr. T. Părău, am prezentat studiul unui extract antigenic ascaridian liofilizat (3). Produs brut, obținut prin extragerea rapidă a ascarizilor în mediu salin hipotonic, la rece (între +1 °C și +4 °C) — după prealabila îndepărtare a lichidului perienteric — apoi concentrat și conservat prin liofilizare, extractul antigenic este un complex lipido-glucido-proteic, în care glucoza reprezintă 41,5 g% din substanța uscată, proteinele 16,05 %, iar lipidele 1,025 %.

Timp de peste 10 ani acest produs biologic a fost utilizat atât în experimentele de hipersensibilizare și imunizare al diverselor animale de laborator, cât și în imunodiagnostic, în special ca antigen pentru intradermoreacții (IDR). Limitele sensibilității și specificității sale fiindu-ne actualmente suficient de cunoscute, am considerat oportun să încercăm obținerea unor produși ameliorați.

Metodă de lucru

Cercetările lui Canning au demonstrat încă din 1929 specificitatea antigenică diferită a țesuturilor viermilor nematozi și o dată cu aceasta și marea lor complexitate antigenică (6). Ulterior problema a fost complicată și mai mult prin demonstrarea existenței unor antigene funcționale, metabolice (7, 16, 14, 15) și a unei antigenități specifice, de stadiu evolutiv (5, 13).

Încă din 1962 ne-a apărut evident (3, 8) că, dacă tendința unor cercetători de a separa prin diverse procedee fracțiuni de mare puritate și specificitate, prezintă un indiscutabil interes teoretic (pentru cercetare), ea nu poate duce însă la ameliorarea imunodiagnosticului infestațiilor naturale și experimentale. Practica a arătat că se pot obține cu astfel de fracții antiseruri specifice, dar nu se pot obține reacții concludente „in vitro” față de serurile animalelor infestate, deoarece în infestații imunizarea nu se realizează față de una sau câteva fracții antigenice izolate, ci față de un complex de substanțe, constind în produși de secreție, excreție și din produși somatici rezultați din liza viermilor (în diferite stadii) sau a cuticulelor lor (11). Din acest motiv, considerăm că unui bun produs antigenic pentru imunodiagnosticul infestațiilor naturale sau experimentale, trebuie printre altele să i se asigure următoarele calități:

— să fie cât mai puțin alterat prin autoliză sau prin tehnici brutale de fracționare;

- să fie debarasat de fracțiile reputate a fi de specialitate scăzută;
- să i se păstreze caracterul complex de „mozaic” antigenic.

În conformitate cu acest punct de vedere am preparat și studiat doi produși antigenici:

- I. Un nou antigen brut (B),
- II. Un antigen delipidat (D), derivat din primul.

Tehnica de preparare

I. Antigenul brut (B). Exemplare vii de *Ascaris suum* (Goeze, 1782), au fost prelevate din abator și transportate în vas izoterm. După o rapidă dar minuțioasă spălare în jet de apă rece au fost ținuți 30 minute în soluție de sublimat, apoi din nou spălați, cu apă distilată. Viermii au fost disecați pentru îndepărtarea lichidului perienteric și a aparatelor genitale, apoi tăiați în bucățele mărunte. 250 g au fost apoi extrase în soluție salină izotonică, la +2°C, timp de 24 de ore. Lichidul, separat de reziduuri prin decantare, a fost filtrat prin hirtie, apoi prin Seitz. În continuare a fost liofilizat cu aparatul „Usifroid” tip M.S. 12, în sticlute de penicilină a câte 3 ml, în decurs de 6 ore, la o temperatură minimă de -70°C, în variații de vid între 7 și 20 mm coloană de Hg.

Pornind astfel de la 3 ml extract salin s-a obținut în medie 21 mg substanță uscată pe flacon. Aceasta, extrem de higroscopică, prezintă o culoare aurie și un puternic miros aromatic, caracteristic ascarizilor. Rehidratată cu apă distilată, la volumul inițial de 3 ml, substanța reprezintă antigenul brut.

II. Antigenul delipidat (D). Înaintea filtrării prin Seitz, extractul brut a fost tratat și agitat la rece (+4°C), o oră, cu un volum egal de eter sulfuric. După decantare în pîlnie separatoare, produsul a fost liofilizat ca mai sus. Reziduul uscat, în cantitate sensibil egală (20 mg), se prezintă ca o pulbere aciculară, foarte higroscopică, dar de culoare albă și lipsită de miros. Pentru diverse determinări antigenul delipidat a fost obținut prin rehidratarea cu apă distilată la volumul inițial de 3 ml.

Caracterizarea biochimică

Pentru determinarea conținutului de hidrați de carbon s-a utilizat metoda King; pentru proteine metoda Jale, Boussier-Badin, iar pentru lipide metoda cromatografică. Valorile medii obținute, exprimate în %, din substanța uscată, sînt prezentate în tabelul nr. I, în care, pentru orientare și comparație, pe ultima coloană orizontală, este prezentată în același mod compoziția substanței ascaridiene uscate, după v. Brand (4).

Tabelul nr. 1

În g% subst. uscată	Hidrați de carbon, metoda King	Proteine, metoda Jale, Boussier-Badin	Lipide, metoda cromatografică
antigen B brut	24,230	57,85	1,040
antigen D delipidat	25,064	46,30	0,095
A. lumbric. subst. uscată	14—24	48—57	1,3—1,6

Electroforegrama efectuată cu un aparat tip Donovan, la o tensiune de 180 V și cu 0,08 mAmp pe bandă, a separat următoarele fracții proteice, în raport cu serul uman normal.

Tabelul nr. 2

fracții	antigen brut	antigen delipidat
A	17,5 %	—
alfa 2	17,5 %	21 %
beta	21,5 %	18 %
gamma	61 %	51 %

În vederea experiențelor de imunizare activă a animalelor de laborator e de reținut că, flaconul de antigen brut conține 11,56 mg proteine, în timp ce flaconul de antigen delipidat conține doar 9,26 mg proteine.

Compoziția celor două antigene în acizi aminați liberi și conjugați, precum și în baze purinice și pirimidinice a fost studiată cu ajutorul cromatografului autoanalizor JLC-3BC2.

Pentru determinarea conținutului în acizi aminați liberi și conjugați, după deproteinizare, antigenele au fost hidrolizate 24 de ore la 130 °C, cu ClH₅N, în atmosferă închisă; după evaporarea ClH, probele au fost reluate cu tampon de citrat de sodiu cu pH=2,2, apoi introduse în coloană cu rășină Aminex A4 pentru separarea acizilor aminați acizi și neutrii, sau în coloană Aminex A5 pentru acizii aminați bazici. S-au obținut rezultatele prezentate în tabelul nr. 3.

Tabelul nr. 3

Antigen brut

ac. aminat	mg % subst. uscată	mol/ml
ac. aspartic	0,2432	$4,57 \times 10^{-7}$
treonină	0,0112	$0,2377 \times 10^{-7}$
serină	—	—
ac. glutamic	0,4310	$7,33 \times 10^{-7}$
prolină	0,0358	$0,78 \times 10^{-7}$
glicocol	0,121	$4,05 \times 10^{-7}$
alanină	0,1544	$4,34 \times 10^{-7}$
valină	0,104	$2,605 \times 10^{-7}$
metionină	cantitate nedozabilă	
izoleucină	0,0628	$1,57 \times 10^{-7}$
leucină	0,2160	$5,42 \times 10^{-7}$
tirozină	0,0252	$0,63 \times 10^{-7}$
fenilalanină	0,0980	$2,47 \times 10^{-7}$

Tabelul nr. 4
Antigen delipidat

ac. aminat	mg/% subst. uscată	mol/ml
ac. aspartic	0,1540	$2,092 \times 10^{-7}$
treonină	0,00272	$0,0572 \times 10^{-7}$
serină	—	—
ac. glutamic	0,289	$3,55 \times 10^{-7}$
prolină	0,022	$0,345 \times 10^{-7}$
glicocol	0,0541	$1,21 \times 10^{-7}$
alanină	0,2550	$5,1 \times 10^{-7}$
valină	0,0675	$1,04 \times 10^{-7}$
metionină	cantitate nedozabilă	
izoleucină	0,0331	$0,45 \times 10^{-7}$
leucină	0,0780	$1,075 \times 10^{-7}$
tirozină	0,0190	$0,190 \times 10^{-7}$
fenilalanină	0,0577	$0,63 \times 10^{-7}$

Pentru separarea bazelor purinice și pirimidinice probele au fost hidrolizate 5 ore la 110°C, cu ClH₅N; după evaporarea ClH, reziduul a fost reluat cu un tampon de acetat de sodiu cu pH=4,4 apoi introdus în coloană Dowex. S-au obținut datele expuse în tabelul nr. 5 și 6.

Tabelul nr. 5
Baze purinice

antigenul	adenină mg'/%	guanină mg' %	hipoxantină mg'/%
a. brut	0,1290	nedozabil	dozabil, nu a putut fi determinată din lipsă de standard
a. delipidat	0,1370	nedozabil	

Tabelul nr. 6
Baze pirimidinice

antigenul	citozină mg'/%	uracil mg'/%	timină mg'/%
a. brut	nedozabil	0,0467	nedozabil
a. delipidat	nedozabil	0,0270	nedozabil

Datele obținute prin determinările biochimice enumerate, sugerează următoarele observații:

— Antigenul extras în 1962, în mediu salin hipotonic, prezenta o predominanță procentuală a hidraților de carbon și în concordanță cu aceasta calități de alergen.

— Antigenele noi studiate în lucrarea de față, prezintă predominanța procentuală a proteinelor.

— Tratarea cu eter sulfuric a extractului brut nu a modificat nivelul hidraților de carbon, dar a diminuat considerabil pe cel al proteinelor și lipidelor (în proteinograme diferențele apar în fracțiile electroforetice alfa 2 și beta).

— Delipidarea a adus cu sine scăderi semnificative ale acizilor aminați liberi și conjugați (cu excepția alaninei), precum și a uracilului.

Testări biologice preliminare

1. Au fost imunizați 20 de cobai, prin infestație experimentală cu doza subletală de aproximativ 500 ouă embrionate de 9 săptămîni, din specia *Ascaris suum*.

Serurile au fost recoltate de la 7 cobai, care au supraviețuit primoinfestației timp de 13 luni, apoi în săptămîinile 2 și 4 după o reinfestație cu aceeași doză subletală de ouă embrionate. Cu aceste seruri și cu serurile a două animale martore indemne s-au executat Ring-teste, utilizînd ambele antigene, diluate de 10 ori după rehidratare.

Cu excepția serurilor martor, toate celelalte au dat reacții pozitive la 5', 20' și la o oră de ședere la termostatul de 37°C, analog cu ambele antigene: o dată pozitiv, de două ori slab pozitiv și de 4 ori intens pozitiv.

2. Au fost imunizate două loturi de câte 20 de cobai, prin 4 injecții intraperitoneale de antigene (brut și delipidat) incorporate în adjuvantul Freund complet (preparat după rețeta Lacapère și conținînd 1,25 g greutate uscată de B.K., pe ml). S-a incorporat echivalentul a 20 mg proteină antigen pe ml adjuvant. Injecțiile au fost separate prin intervale de o săptămîină. Serurile au fost recoltate în a 5-a și a 7-a săptămîină.

Antigenele au fost utilizate în Ring-test în aceleași condiții ca mai sus, cu serurile omologe și heterologe și cu două seruri martor.

Nouă seruri anti-brut au reacționat la fel cu ambele antigene: de trei ori negativ, de 4 ori slab pozitiv și de două ori intens pozitiv.

11 seruri anti-delipidat au dat următoarele rezultate: unul reacție negativă cu ambele antigene; două seruri au hemolizat în reacție; cinci seruri au dat reacții slab pozitive, iar trei reacții intens pozitive.

Toate serurile martor au fost negative.

Pentru verificarea Ring-testelor, serurile au fost migrate imunelectroforetic în prezența ambelor antigene. S-a folosit aparatul „Selman Instrument Company”. Migrarea s-a realizat în gel de agar 1%, cu tampon medinal-veronal cu un pH=8,6. Forța ionică 0,1 la 50 mAmp, timp de 5 ore.

S-au obținut arcuri de precipitare cu toate serurile imune testate (cu excepția celor martor). Intensitatea arcurilor a variat de la „slab” la „foarte accentuat”. Arcuri foarte accentuate au dat 6 din cele 7 seruri provenite de la animale aflate la 4 săptămîni de la reinfestație.

Arcurile de precipitare au apărut totdeauna la nivelul fracțiunii electroforetice alfa 2.

Concluzii

1. — Au fost preparate și caracterizate biochimic două extracte antigenice din *Ascaris suum* (Goeze 1782); un extract salin brut și unul salin delipidat.

2. — Tehnica de delipidare a diminuat semnificativ conținutul în lipide, proteine, acizi aminați și baze purinice și pirimidinice al antigenului delipidat, dar nu a modificat conținutul în hidrați de carbon.

3. — Sub raportul activității biologice, cercetările preliminare, efectuate cu Ring-test și migrare imunelectroforetică, față de antiserurile obținute prin imunizare activă și prin infestații, indică sensibilitate în imunodiagnostic.

4. — În etapa actuală nu s-au obținut încă date asupra gradului de specificitate antigenică.

5. — În ciuda diferențelor de ordin biochimic, cu testele imunologice utilizate pînă în prezent nu au putut fi sesizate diferențe de comportament biologic.

Sosit la redacție: 30 aprilie 1971.

Bibliografie

1. ANDREWS M. J.: Journ. Parasitol. (1962), 48, 1, 3;
2. BIGUET J.: Bull. Soc. Pharm. Lille (1968), 1;
3. BORNUZ M., BUDA AURELIA, PĂRĂU T.: Studii asupra unui antigen ascaridian. Lucrare prezentată la Simpozionul de parazitologie, Filiala U.S.S.M. Tirgu Mureș, februarie 1962;
4. BRAND V. TH.: Biochemistry of parasites. Acad. Press, New York-London, 1968;
5. CAMPBELL C. H.: Journ. Parasitol. (1955), 41, 483;
6. CANNING G. A.: Amer. J. Journ. Hyg. (1929), 9, 207;
7. CHANDLER A. C.: Amer. Journ. Hyg. (1937), 26, 309;
8. COUDERT J.: Ann. Biol. Clin. (1961), 1—2, 3;
9. DAHNOVICI V., BORNUZ M.: Viața medicală (1962), 10, 517;
10. KENT N. H.: Exp. Parasitol. (1963), 13, 1, 45;
11. LEIKINA E. S.: Bull. O.M.S. (1965), 32, 699;
12. LINCICOME D. R.: Experim. Parasitol (1962), 12, 211;
13. OLIVER-GONZALES J.: J. Inf. Dis. (1941), 69, 254;
14. SARLES M. P.: J. Inf. Dis. (1938), 62, 337;
15. TALIAFERRO W. H.: Amer. Journ. Trop. Med. (1940), 20, 2, 169;
16. TALIAFERRO W. H., SARLES M. P.: Science (1937), 85, 49;
17. THORSON E. R.: Experim. Parasitol. (1963), 13, 1, 3.