

PURIFICAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* DE EXSUDATO PERITONEAL DE CAMUNDONGO, EM COLUNA DE ALGODÃO DE NYLON⁽¹⁾

USE OF NYLON-COTTON COLUMNS FOR THE PURIFICATION OF *TOXOPLASMA GONDII*

AUGUSTA KIYOMI TAKEDA ⁽²⁾
MATHILDE RASKIN ⁽²⁾
RENAME DANEMANN ⁽³⁾

SUMMARY

A simple procedure for purification of toxoplasma from mouse peritoneal exudate in columns of nylon-cotton is described, showing reproductibility and satisfactory recovering of the parasites.

INTRODUÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de toxoplasmas puros, sem a presença de outras células habitualmente encontradas no exsudato peritoneal de camundongos inoculados com estes parasitos.

Os métodos descritos para a mesma finalidade, tais como os de FULTON & TURK^{1, 3}, TSUNEMATSU² e YANOWSKY⁴, são trabalhosos e apresentam rendimento relativamente baixo.

A técnica ora descrita, em que é empregado o algodão de nylon, é de fácil manipulação, apresenta rendimento alto e reduz os riscos de contaminação do pessoal técnico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exsudatos peritoneais foram obtidos de camundongos inoculados com toxoplasmas, de acordo com Yanovisky.

Foram utilizadas colunas de algodão de

nylon⁽⁴⁾, lavado durante 10 dias, com trocas diárias de água destilada; essas colunas foram montadas em buretas de 1 cm (diâmetro externo), colocando-se 2 g de algodão de maneira a atingir a altura aproximada de 25 cm. As colunas foram previamente equilibradas com o líquido de eluição.

Como líquido de eluição foi utilizada solução tampão fosfatada 0,15 M — NaCl 0,15 M — pH 7,2.

Na presente técnica, contrariamente ao preconizado por RABINOWITZ⁵ e GARVIN⁶ para purificação de leucócitos, não foi utilizada a incubação prévia das colunas, a 37°C, 30 minutos, em virtude de observações preliminares terem demonstrado que tal procedimento teve efeito contrário, prejudicando a purificação das amostras.

Os exsudatos, imediatamente após a colheita, foram submetidos a contagens de toxoplasmas e células/ml, em câmara de Neubauer. Em seguida foram centrifuga-

- (1) Trabalho realizado na Seção de Imunologia da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.
- (2) Do Instituto Adolfo Lutz
- (3) Estagiária da Seção de Imunologia da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.
- (4) LP-1 Leuko Pak R. Leucocyte filter, Fenwal Laboratories, Div. Travenol Labor. Inc. Morton Grove, Illinois 60053.

dos a 4430 G durante 15 minutos e, de acôrdo com a contagem inicial, os sedimentos foram ressuspensos em volumes variáveis dos respectivos sobrenadantes, de maneira a obter-se aproximadamente 100×10^6 toxoplasmas/ml.

Os exsudatos assim corrigidos foram adicionados, pouco a pouco, ao tampo da coluna e, após penetração total, foi iniciada a eluição, coletando-se volumes de 1 ml, com velocidade de 15 gotas por minuto. De cada tubo de eluição foram feitas contagens de toxoplasmas e células/ml.

Repasagens dos eluatos em colunas de 0,7 cm x 4 cm (diâmetro externo) foram feitas para completar a purificação das amostras.

O algodão de nylon pode ser reaproveitado, lavando-se a coluna com EDTA a 2% e, depois, várias vezes com água destilada; a seguir, seca-se o algodão em estufa a 37°C.

RESULTADOS

O valor médio das contagens iniciais de sete amostras diferentes de exsudatos peritoneais de camundongos inoculados com toxoplasmas foi 97×10^6 toxoplasmas/ml e 71×10^6 células/ml.

De acôrdo com os resultados obtidos, aproximadamente 92% das células presentes no exsudato peritoneal foram retidas. Cerca de 8% (hemácias e células mononucleares pequenas), foram eluídas juntamente com os toxoplasmas, mas não distribuídas homogêneamente, sendo que em alguns eluatos, como por exemplo no tubo 4, praticamente a quantidade de células foi desprezível em relação ao grande número de toxoplasmas, como mostram as fotografias do esfregaço inicial (Fig. 1) e do tubo 4 (Fig. 2).

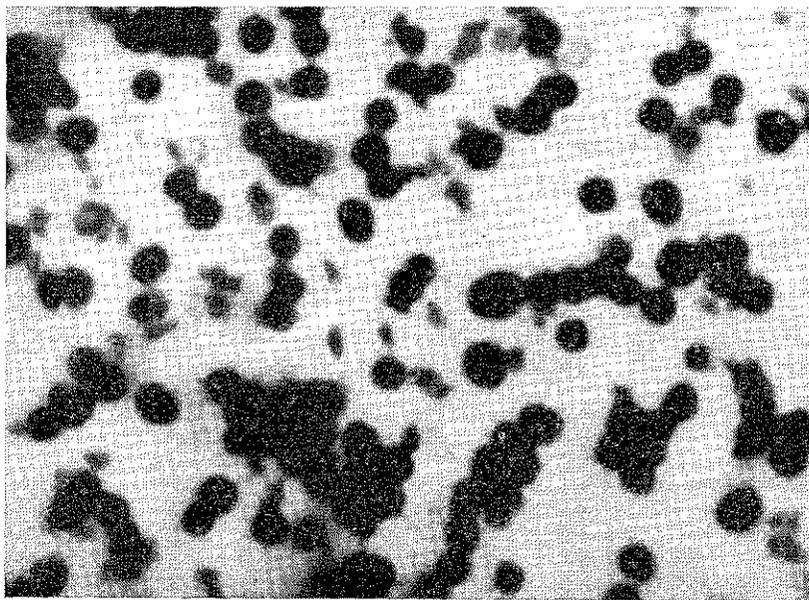


Fig. 1 — Exsudato peritoneal de camundongo infectado com *Toxoplasma gondii*, antes de passar na coluna.

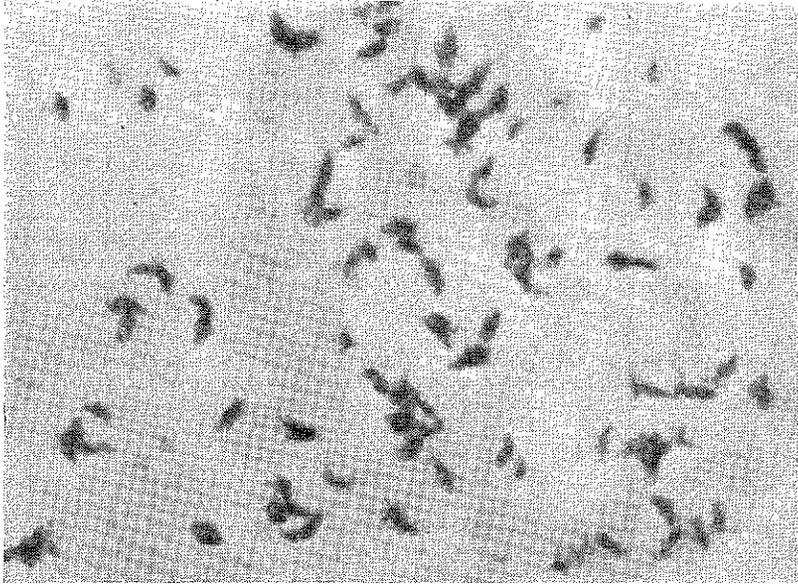


Fig. 2 — Toxoplasmas praticamente puros, após passagem em coluna de algodão de nylon (tubo n.º 4).

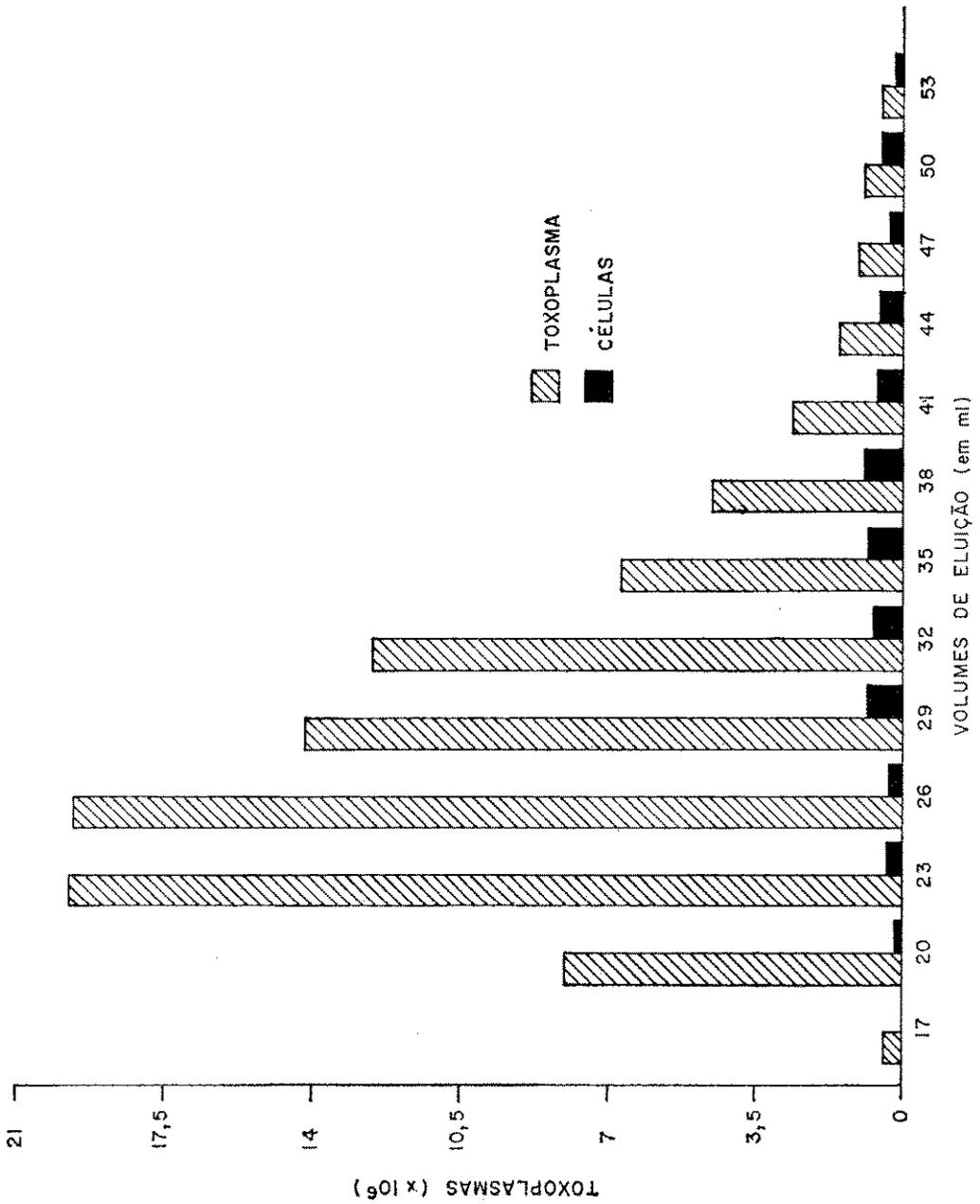
Os eluatos com toxoplasmas, em três amostras que foram repassadas em coluna de algodão de nylon, na ausência de proteína e de sais de cálcio e magnésio, foram

eluídos praticamente puros, havendo, porém, redução do número de parasitos.

Os valores médios de sete experimentos são apresentados no quadro seguinte e as médias de suas distribuições, no gráfico.

Valores médios e relação do Toxoplasma-célula

N.º dos Tubos	Valores Médios		Relação	
	Toxoplasma x 10 ⁶	Células x 10 ⁶	Células eluídas %	Toxoplasma-células %
1	424	0	0,00	100,00
2	7 973	150	0,21	98,15
3	19 778	361	0,51	98,20
4	19 683	316	0,45	98,41
5	14.155	850	1,20	90,40
6	12 582	646	0,90	79,64
7	6 694	796	1,14	90,82
8	4 507	919	1,30	83,10
9	2 581	599	0,84	81,20
10	1 450	522	0,74	73,53
11	1 006	285	0,40	77,90
12	861	446	0,63	65,90
13	463	122	0,17	79,10



RESUMO

É descrito um método simples de purificação de toxoplasma do exsudato peritoneal de camundongos, em coluna de algodão de nylon, mostrando a reprodutibilidade e satisfatória recuperação dos parasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FULTON, J. D. & TURK, J. L. — Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. Lancet 2:1068-9, 1959. Preliminary Communications.
2. TSUNEMATSU, Y. — Purification of *Toxoplasma* by means of sonic vibration and tryptic digestion. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 9(6):556-61, 1960.
3. FULTON, J. D. & SPOONER, D. F. — Preliminary observations on the metabolism of *Toxoplasma gondii*. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg. 51(2):123-4, 1957. Communications.
4. YANOVSKY, J. F. TRAVERSA, O. C.; SCHMUNIS, G. A.; CANTARELLA, A.; PANDIELLA, A. A. & POTHIER, M. S. — Nouvel antigène pour la réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la Toxoplasmose. Ann. Parasit. Hum. Comp. 43(5):539-44, 1968.
5. RABINOWITZ, Y. — Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns including tissue culture observations. Blood 23(6):811-28, 1964.
6. GARVIN J. E. — Factors affecting the adhesiveness of human leucocytes and platelets in vitro. J. Exp. Med. 114(1):51-73, 1961.

Recebido para publicação em 10 de dezembro de 1969

