

## ESTUDOS SÔBRE A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO EM BRUCELOSE

### I — Influência da ordem de se misturar antígeno, anticorpo e complemento, sôbre a quantidade de complemento fixado

José Oliveira de ALMEIDA (1)

#### RESUMO

Utilizando o método cinético para dosagem de complemento residual, em reações de fixação de complemento entre sôro humano bruceloso e antígeno de Boivin de *Brucella abortus*, demonstrou-se maior fixação de complemento, quando o complemento é juntado à mistura sôro-antígeno, do que em reações nas quais se acrescentou ao sôro uma mistura de antígeno e complemento.

Determinando-se os parâmetros das curvas hemolíticas, verificou-se que, para valores iguais de complemento fixado, as linhas de regressão, no sistema logaritmo de tempo versus logitos de hemólise, eram paralelas, indicando que a atividade do complemento não foi alterada pela mistura prévia com o antígeno. A maior fixação dependeria do complemento já encontrar formado o complexo imune. Quando êste se formava em presença de complemento, sua avidéz para complemento seria menor.

De acôrdo com essas verificações, não se pode, para simplificar a técnica qualitativa de fixação de complemento, acrescentar ao sôro a mistura antígeno-complemento. Ao contrário, recomenda-se juntar ao sôro a dose de antígeno e, sômente depois, a quantidade indicada de complemento. A reação catastóiquica na fixação de complemento seria então definida como aquela em que a ordem de misturar os elementos afetaria a quantidade de complemento fixado pelo complexo imune.

#### INTRODUÇÃO

A prova qualitativa de fixação de complemento para exclusão de soros não reagentes é feita em um único tubo em que se distribuem o sôro a examinar, o antígeno e o complemento.

Quando o número de soros a examinar é grande, o método poderia ser simplificado, fazendo-se, num primeiro tempo, a distribuição dos soros e em seguida acrescentando-se a êles a mistura antígeno e complemento. Se tal método pudesse ser empregado, sem afetar a intensidade da reação de fixação do

complemento, os inquéritos sorológicos poderiam ser realizados com menos trabalho técnico e menor possibilidade de erros, pela substituição de três operações de distribuição de reagentes (antígeno, complemento e solução salina) por uma única, em que a mistura dêesses elementos era colocada, de uma única vez, nos tubos com os soros em exame.

No sistema sífilis, com antígeno colesterinado de coração bovino e complemento de cobaia, KOLMER<sup>10</sup> tinha assinalado reações

(1) Professor-catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Prêto da Universidade de São Paulo, Brasil

mais intensas, quando ao sôro se juntava antígeno e à mistura antígeno-sôro, o complemento.

Era portanto de interêsse imediato conhecer se tal fenômeno ocorria no sistema brucelose, para então se estabelecer a técnica para as reações de fixação do complemento, com sôro humano, distribuindo-se os elementos da reação um a um, na ordem mencionada, ou simplificando o método, juntando-se ao sôro humano, a mistura previamente feita de antígeno, complemento e solução salina.

Esta investigação foi levada a efeito com antígenos de *Brucella abortus* e sôro humano bruceloso, observando-se maior fixação, quando o complemento era juntado ao tubo contendo sôro e antígeno. Tratava-se então de uma reação *catastóiquica* em fixação de complemento, no mesmo sentido em que foi definida por PONDER<sup>16</sup> quando observou que a lecitina e a saponina deviam ser distribuídas em certa ordem para que a mistura fôsse mais hemolítica.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Os elementos do sistema hemolítico foram preparados e padronizados de acôrdo com os métodos descritos anteriormente<sup>4</sup>.

A suspensão de hemácias de carneiro é preparada e padronizada de acôrdo com os processos descritos anteriormente<sup>1, 2</sup>. Um tubo (12 × 75 mm) com 0,2 ml de suspensão e 1,8 ml de solução salina deve ter uma transmissão de 18%, em espectrofotômetro Coleman Junior, em comprimento de onda de 580 m $\mu$ . Quando 0,2 ml da suspensão são lisadas em 1,8 ml de água destilada, a transmissão deve ser de 75%.

*Hemolisina anti-carneiro*, preparada em coelhos e glicerizada a 50%. A hemolisina é usada em dose de sensibilização máxima, determinada em presença de solução salina e unidade 50% de complemento<sup>4</sup>.

*Complemento* — Sôro de cobaia, liofilizado, foi usado como complemento, depois de reconstituído com água destilada. Diluições de complemento foram preparadas em solução salina boratada, isenta de cálcio e magnésio, para conter em 0,1 ml 6 unidades

50% de complemento e submúltiplos. O complemento é mantido em gêlo fundente, até o momento de ser usado.

Para a reação de fixação de complemento foram empregados sôro humano bruceloso e antígeno de BOIVIN de *Brucella abortus*.

*Sôro humano* — O sôro humano empregado nesta investigação foi selecionado dentre vários outros que se mostraram reagentes em provas de fixação do complemento e de aglutinação com suspensão de *Brucella abortus*.

*Antígeno de Brucella abortus* — Foi preparado o antígeno tipo BOIVIN<sup>6</sup>, a partir da suspensão de *Brucella abortus* (B-99-2252). Centrifugada a suspensão em SERVALL a 15.000 r.p.m. por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento tratado por ácido tricloroacético N/4 durante 18 horas a frio. O sobrenadante opalescente foi dializado contra água corrente por 10 horas e em água destilada por mais 72 horas. O dializado, de pH 6,8, foi distribuído em ampolas e liofilizado.

O antígeno liofilizado foi reconstituído em solução salina boratada, na proporção de 1 mg por ml. A solução, ligeiramente opalescente, mantém-se perfeitamente em geladeira.

O antígeno foi experimentado com o sôro humano de brucelose, pelo método de isofixação, determinando-se o tipo de curva do sistema e a dose de antígeno a ser empregada (diluição 1/1.200) em reações com 6 unidades de complemento<sup>5</sup>.

#### *Método cinético de dosagem de complemento*

A relação entre tempo necessário para 50% de hemólise ( $K_1$ ) e a concentração de complemento, foi estabelecida medindo-se o grau de hemólise, com as células em suspensão, em um fotômetro, em comprimento de onda de 580 m $\mu$ , segundo o método anteriormente descrito por ALMEIDA<sup>2, 3</sup>.

Quantidades variáveis de complemento, em volume de 1,6 ml, contendo submúltiplos de 6 unidades 50% de complemento, eram misturadas a 0,4 ml de hemácias sensibilizadas. Media-se o tempo necessário a 50% de hemólise, para se estabelecer a relação

ALMEIDA, J. O. de — Estudos sôbre a reação de fixação do complemento em brucelose. I — Influência da ordem de se misturar antígeno, anticorpo e complemento, sôbre a quantidade de complemento fixado. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:63-72, 1967.

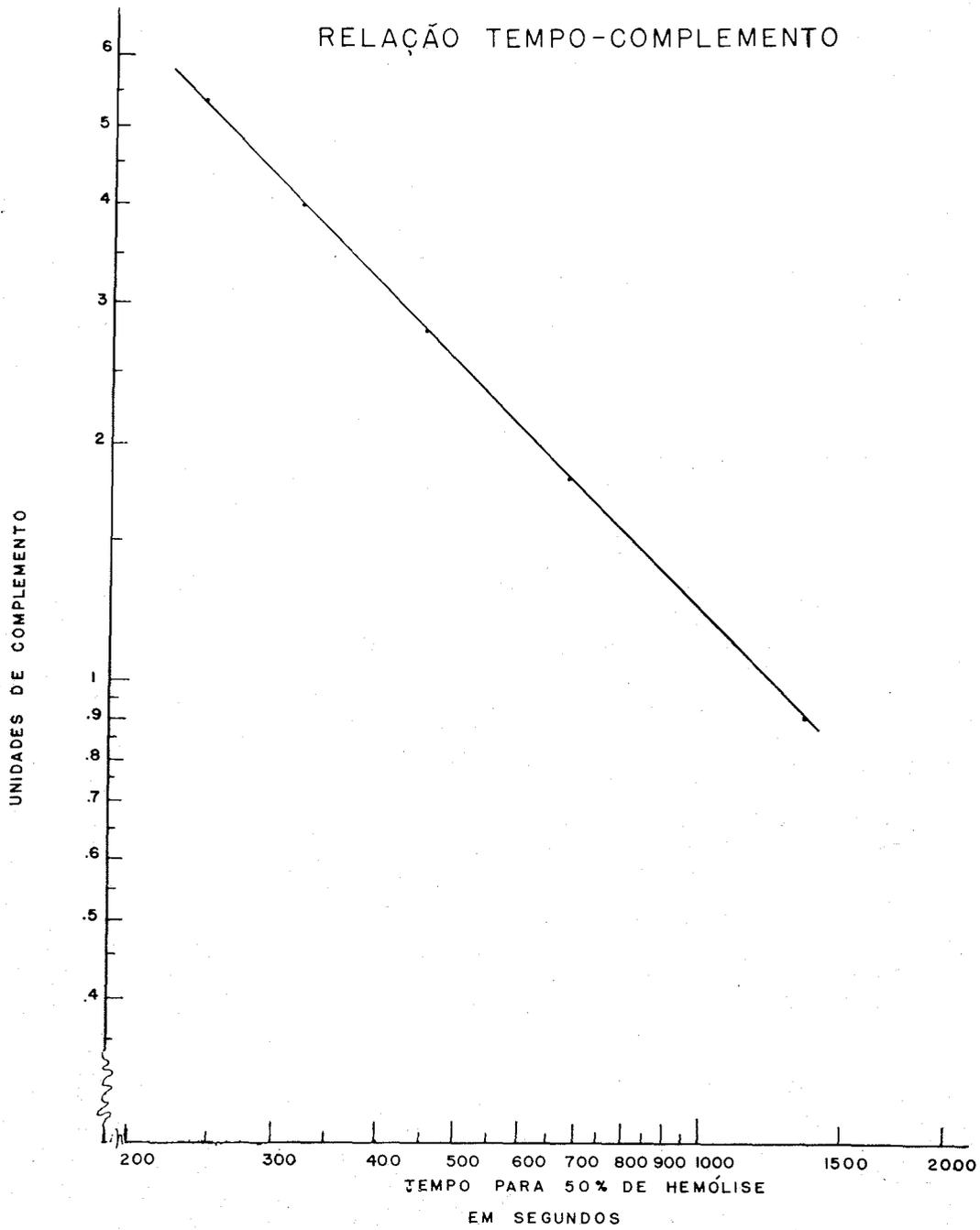


Gráfico 1

entre tempo de hemólise e concentração de complemento. Os dados obtidos são projetados em papel duplo-logarítmico, Gráfico 1.

Por êsse método pode-se determinar a quantidade de complemento existente, pelo tempo necessário à hemólise de 50%.

#### PARTE EXPERIMENTAL

A fixabilidade do complemento foi estudada, *na primeira condição*, em que se fazia a mistura de sôro com o antígeno e, depois de 5 minutos, juntava-se complemento.

- a) Em um frasco de base retangular foram misturados 2 ml da solução a 1/66,7 do sôro humano (bruceloso) e 2 ml da diluição 1/1.200 de antígeno. Foi empregado um excesso de antígeno por ser do tipo I, sua curva de isofixação<sup>5,7</sup>. A mistura foi feita imprimindo-se um movimento de rotação ao frasco, em posição inclinada, durante 5 minutos. Então 2 ml da diluição de complemento (contendo 6 unidades 50% em 0,1 ml) foram juntados, misturando-se bem, como anteriormente. Anotou-se o tempo em que a mistura foi feita.
- b) Foram distribuídos 1,6 ml da mistura a uma série de tubos de 12 × 75 mm padronizados e postos a incubar a 37°C em banho-maria.
- c) Depois de 10 minutos de incubação, o primeiro tubo é retirado do banho-maria
- d) Medir o tempo necessário para as transmissões de 25%, 30%, 40%, 50% e 65%, correspondentes às hemólises de 5%, 20%, 30%, 50%, 60% e 75%.
- e) Para evitar erros na leitura dos tempos, fotografias foram tomadas em série do limbo do fotômetro e do cronômetro. Além de documentar a experiência, o método permitiu grande precisão na leitura.
- f) O processo é repetido aos 30, 60, 80 e 140 minutos de incubação a 37°C.
- g) Os dados obtidos, Quadro I (tempo em segundos para os vários graus de hemólise), são projetados num sistema de coordenadas, tendo por ordenadas os logaritmos de tempo (em segundos) e por abcissas os logitos das hemólises correspondentes (Gráfico 2). Determinam-se assim os valores de  $K_t$ , como o tempo necessário para 50% de hemólise, nas misturas incubadas por vários períodos de tempo.
- h) Conhecidos os valores de  $K_t$ , determinam-se, gráficamente (Gráfico 1) o nú-

QUADRO I

Cinética de hemólise em reações nas quais o complemento foi juntado à mistura de sôro e antígeno

Incubação a 37°C	Tempo necessário em segundos para hemólise de					
	5%	20%	30%	50%	60%	75%
10	230	275	296	326	340	375
30	302	366	400	455	495	564
60	460	560	612	690	754	848
80	465	538	684	806	905	1058
140	600	850	1200	1350	1550	1850

SISTEMA BRUCELOSE  
 CINÉTICA DA HEMÓLISE POR COMPLEMENTO RESIDUAL  
 NAS REAÇÕES:

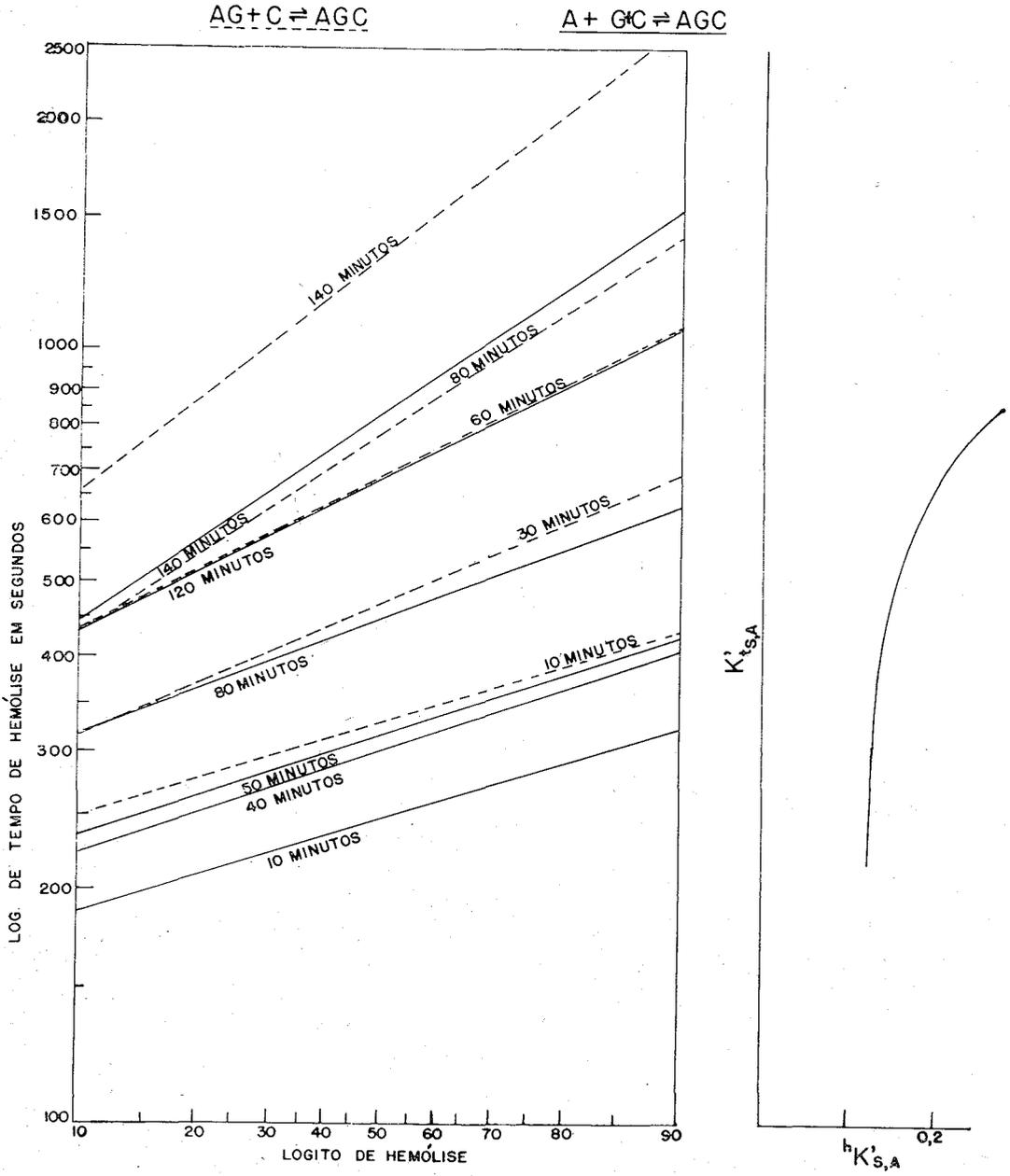


Gráfico 2

mero de unidades de complemento existentes. O número de unidades de complemento fixadas é a diferença entre o complemento inicialmente presente (6 unidades) e o complemento assim calculado (Quadro II).

QUADRO II

Quantidades de complemento fixadas em vários tempos de incubação, em reações nas quais 6 unidades 50% de complemento foram juntadas à mistura soro e antígeno

Incubação a 37°C	Tempo necessário a 50% de hemólise	Complemento	
		livre (calculado)	fixado
10	326 s	4,0	2,0
30	455 s	2,8	3,2
60	690 s	1,8	4,2
80	806 s	1,6	4,4
140	1350 s	0,9	5,1

A fixabilidade do complemento, quando este, de mistura com o antígeno, era juntado ao soro, foi determinada por método semelhante.

a) Em um frasco igual ao primeiro, de base quadrangular, foram colocados 2 ml da diluição 1/66,7 do soro humano (bruceloso). Juntaram-se então 4 ml da mistura de partes iguais de

antígeno (diluído a 1/1.200) e complemento (contendo 6 unidades em 0,1 ml).

b) Volumes de 1,6 ml da mistura foram distribuídos em tubos padronizados de 12 x 75 mm, mantidos a 37°C. No fim de 10 minutos, ao primeiro tubo foram juntados 0,4 ml de hemácias sensibilizadas, medindo-se os tempos necessários para vários graus de hemólise. Repetir o processo aos 40, 50, 80, 120 e 140 minutos de incubação (Quadro III).

c) Os logitos de hemólise são projetados, em abcissas contra os logaritmos dos tempos em segundos. Traçada a linha de regressão (Gráfico 2) para cada medida, determinam-se os tempos necessários para 50% de hemólise, como anteriormente.

d) Calcula-se, pelo valor de  $K_t$ , o número de unidades de complemento residual e daí a quantidade de complemento fixado no fim dos vários períodos de incubação.

Os resultados são apresentados no Quadro IV.

Para comparar as duas experiências e visualizar a reação catastrófica no sistema brucelose foram projetadas as quantidades de complemento fixadas contra os tempos de incubação (Gráfico 3), nas duas condições em que os elementos foram misturados.

QUADRO III

Cinética de hemólise em reações nas quais a mistura de complemento e antígeno foi juntada ao soro

Incubação a 37°C	Tempo necessário em segundos para hemólise de					
	5%	20%	30%	50%	60%	75%
10	174	206	235	245	258	280
40	215	255	278	304	328	350
50	210	260	285	313	332	360
80	295	364	398	447	484	537
120	400	510	568	660	732	850
140	414	565	650	780	900	1120

SISTEMA BRUCELOSE

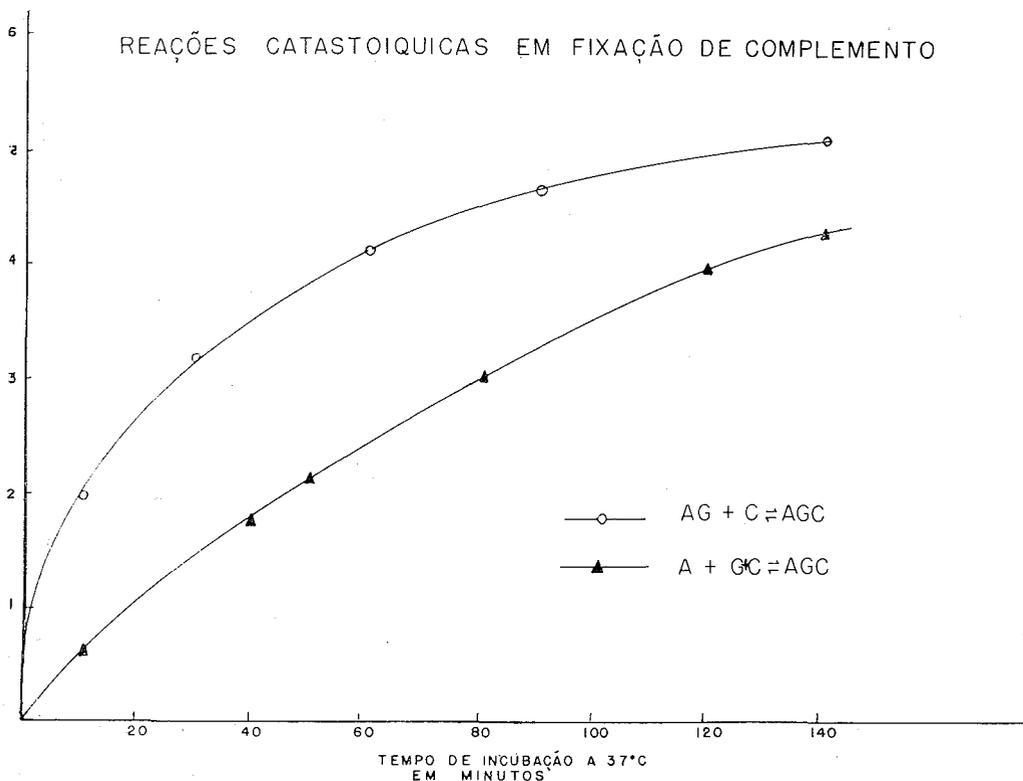


Gráfico 3.

QUADRO IV

Quantidades de complemento fixadas em vários tempos de incubação, em reações nas quais se juntou ao sôro, a mistura antígeno-complemento (6 unidades 50%)

Incubação a 37°C	Tempo necessário a 50% de hemólise	Complemento	
		livre (calculado)	fixado
10	245 s	5,4	0,6
40	304 s	4,2	1,8
50	313 s	3,9	2,1
80	447 s	2,9	3,1
120	660 s	1,9	4,1
140	780 s	1,7	4,3

DISCUSSÃO

A avaliação da atividade hemolítica do complemento por método cinético foi pela

primeira vez apresentada por EAGLE<sup>9</sup> em 1929, embora VON KROCH<sup>18, 19</sup> já tivesse correlacionado tempo de incubação com o grau de hemólise, em 1909 e em 1916.

Em 1947 ALMEIDA<sup>1</sup> apresentou os fundamentos de um método de dosagem de complemento, aplicando a relação logística ao sistema hemolítico, medindo o grau de hemólise, com as células em suspensão, em um foto-colorímetro. Poder-se-ia então aplicar a relação de VON KROCH, em sua forma mais geral, na medida do complemento residual<sup>2</sup>, em reações de hemólise feitas em uma variedade de condições<sup>3, 7, 11</sup>. Últimamente o método cinético foi redescrito, dentro dos mesmos princípios, para a dosagem do complemento por PLESCIA & col.<sup>15</sup>.

A equação de VON KROCH em sua forma geral:

$$x_t = K_{x_t} (y/(1-y))^{h_{x_t}}$$

(em que  $x$  significa complemento,  $y$  o grau de hemólise,  $t$  tempo de reação) poderia ser empregada para a lise em tempos variáveis, por uma quantidade constante de complemento ( $x = 1$ ) na tradução das relações entre tempo de incubação e grau de hemólise, como

$$t = K_t (y/(1-y))^{h_t}$$

ALMEIDA<sup>3</sup> mostrou que dentro de certos intervalos de variação de  $x$ , a relação entre a concentração ( $C$ ) de complemento e o tempo necessário para 50% de hemólise ( $K_t$ ) podia ser expressa como:

$$C K_t^n = k$$

em que  $n$  e  $k$  são constantes.

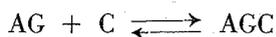
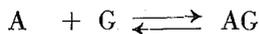
Então, em projeção logarítmica

$$\log C = \log k - n \cdot \log K_t$$

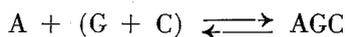
Conhecido o tempo necessário a 50% de hemólise, determina-se a quantidade de complemento presente.

Por êsse método foram determinadas, as quantidades de complemento livres, depois de vários períodos de incubação e então, o número de unidades de complemento fixado. Os dados são apresentados nos Quadros II e IV, demonstrando haver diferenças na fixação do complemento, nas duas condições seguintes:

- 1.º) A um volume de sôro diluído (A) juntou-se um volume de antígeno (G), deixando-se a mistura por 5 minutos a 37°C, com freqüente agitação, e em seguida, um volume de complemento (C):



- 2.º) A um volume de sôro bruceloso e diluído (A), juntou-se a mistura antígeno-complemento (G + C):



Na primeira condição da experiência, há primeiramente formação do complexo antígeno-anticorpo. O complemento é juntado

ao complexo, tendo uma grande superfície reativa, ávida de complemento. No segundo caso, o antígeno é diluído em um volume de complemento e poder-se-ia admitir que a diferença quanto ao complemento fixado fôsse motivada pela concentração do antígeno, menor pela diluição no complemento. O argumento não procede, pois foi empregado um excesso de antígeno, por ser o sistema do tipo I de isofixação (ALMEIDA<sup>5</sup>). Não se poderá também admitir que êsse excesso de antígeno produzisse uma inibição na formação do complexo imune e decorrente menor fixação de complemento, pois na primeira condição experimental, a concentração maior de antígeno não impediu a maior fixação do complemento, então observada.

Comparando os resultados, apresentados nos Quadros II, IV e no Gráfico 3, concluímos que maior fixação do complemento se observa quando êste é juntado ao complexo antígeno-anticorpo, formado minutos antes. A fixação do complemento, rápida no início vai aos poucos perdendo sua velocidade, tornando-se a curva de fixação assintótica ao eixo das abscissas (tempo de incubação).

#### QUADRO V

Valores dos parâmetros  $K_t$  e  $h_t$  para o complemento residual em reações incubadas por diferentes períodos de tempo a 37°C

Tempo de incubação a 37°C em minutos	$K_t$	$h_t$
	Complemento	
0	225	0,382
	AG + C	
10	326	0,175
30	455	0,171
60	690	0,165
80	806	0,259
140	1350	0,285
	A + (G + C)	
10	245	0,109
40	304	0,126
50	313	0,127
80	447	0,154
120	660	0,200
140	780	0,244

ção), procurando atingir um equilíbrio (90 a 140 minutos de incubação).

O antígeno, quando em mistura com o complemento, poderia afetar a perda de atividade complementar. Para investigar o possível efeito do antígeno sôbre o complemento, determinamos, nas duas condições da experiência, os valores dos parâmetros  $K_t$  e  $h_t$ , para vários tempos de incubação (Quadro V).

A inclinação da linha de regressão no sistema de coordenadas, logaritmos de tempo e logitos de hemólise, representa a atividade do complemento e esta é uma função da quantidade de complemento fixado, como demonstraram WADSWORTH & col.<sup>20</sup>, THOMPSON & MALTANER<sup>17</sup> e ALMEIDA<sup>6</sup>. No Quadro VI podemos verificar que os valores de  $h_t$  em ambas as condições não são significativamente diferentes, mas dependentes, em ambos os casos, da quantidade de complemento fixado. A diferença observada na fixabilidade do complexo imune decorreria da concentração relativa de complemento, por ocasião da formação do complexo imune.

#### QUADRO VI

Valores de  $h_t$  para curvas hemolíticas com complemento residual aproximadamente de igual concentração

A + (G + C)		AG + C	
Complemento fixado	$h_t$	Complemento fixado	$h_t$
2,1	0,13	2,0	0,08
3,1	0,15	3,2	0,17
4,1	0,20	4,2	0,17
4,3	0,25	4,4	0,28

A menor fixação de complemento observada quando se junta ao sôro, a mistura complemento-antígeno, contraindica êste método, em sorodiagnose da brucelose por reação de fixação de complemento.

#### SUMMARY

*Studies on complement-fixation test for brucellosis. I — Influence of the order of mixing antigen, antibody and complement on the amount of complement fixed.*

Complement-fixation tests were carried out with human brucellotic serum and Boivin antigen from *Brucella abortus*, in two experimental conditions. In the first one, complement was dispensed 5 minutes after the addition of the antigen to the immune serum, as usual. In the second condition, in order to minimize the technical work, antigen and complement were mixed and then, added to the serum.

Complement-fixation was followed up during the incubation at 37°C, in successive samples withdrawn from the reaction mixtures. Complement was titrated by kinetic method, based on the relationship between time required for 50-per-cent hemolysis and concentration of complement.

It was found that the activity of complement, in both conditions, was not changed, as far as judged by the slope of the regression line drawn when logarithms of time, in seconds, were plotted against logits of hemolysis. It was, however, observed that more complement was fixed, in the first condition, when guinea-pig complement was added to the immune-complex.

From these observations, confirming previous ones in other systems, it should not be permitted, for the sake of the sensitivity of the complement fixation test for brucellosis, to alter the order in which the reagents are mixed.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. O. — Equivalência entre tempo de hemólise e concentração de complemento. *Rev. Paul. Med.* 30:44-45, 1947.
2. ALMEIDA, J. O. — O tempo de hemólise nas reações de fixação do complemento. Relações quantitativas entre tempo de hemólise e concentração de complemento no sistema hemolítico anti-carneiro. *Rev. Brasil. Biol.* 9:249-260, 1949.
3. ALMEIDA, J. O. — *Contribuição para o estudo das reações quantitativas de fixação do complemento. I — O sistema hemolítico.* Tese. Faculdade de Medicina de São Paulo. Mimeografado. 252 pp., 1950.
4. ALMEIDA, J. O. — Técnica da reação de Wassermann quantitativa. Emprêgo do colorímetro foto-elétrico na padronização dos reagentes e na leitura da reação. *Hospital (Rio)* 35:847-898, 1950.

ALMEIDA, J. O. de — Estudos sobre a reação de fixação do complemento em brucelose. I — Influência da ordem de se misturar antígeno, anticorpo e complemento, sobre a quantidade de complemento fixado. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:63-72, 1967.

5. ALMEIDA, J. O. — Isofixation curves as a method of standardization of quantitative complement fixation test. *J. Immun.* 76: 259-263, 1956.
6. ALMEIDA, J. O. — Preparo, padronização e comparação de antígenos em reações de fixação de complemento com soros de doentes de lepra. *Rev. Brasil. Leprol.* 26:181-281, 1958.
7. ALMEIDA, J. O. — *Estudo da reação quantitativa de fixação de complemento com antígenos de Brucella abortus*. Tese. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Univ. São Paulo, 1961.
8. BOIVIN, A. & MESROBEANU, L. — Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. Substances azotées et phosphorées acido solubles. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 113:76-79, 1933.
9. EAGLE, H. — The mechanism of complement fixation. *J. Gen. Physiol.* 12:825-844, 1929.
10. KOLMER, J. A. — Studies in the standardization of the Wassermann reaction. XVIII — The influence of the order of mixing serum, antigen and complement and total volume upon complement-fixation reaction in syphilis. *Amer. J. Syph.* 5:290-300, 1921.
11. MALTANER, F. & ALMEIDA, J. O. — The parallel effects of magnesium on the complementary and coagulative activities of blood serum. *Blood* 4:728-733, 1949.
12. MANWARING, W. H. — A quantitative study of hemolytic serum. *J. Infect. Dis.* 2:460-484, 1905.
13. PIROSKY, I.; PIROSKY, R. & D'ALESSANDRO, N. V. — El antígeno glúcido-lípido como fijador de complemento. I — En Brucella. *Rev. Inst. Bact. Malbran* 10:135-143, 1941.
14. PIROSKY, R.; PIROSKY, I. & YALOV, S. — Naturaleza de la reacción de fijación del complemento. I — Aspectos cuantitativos de su mecanismo. *Rev. Inst. Bact. Malbran* 10:242-257, 1941.
15. PLESCIA, O. J.; AMIRAIAN, K. & HEIDELBERGER, M. — A kinetic method for the titration of complement. *Arch. Biochem.* 62:346-354, 1956.
16. PONDER, E. — Hemolysis and Related Phenomena. New York, Grune & Stratton, 398 pp., 1948.
17. THOMPSON, W. R. & MALTANER, F. — On the construction of graphs and tables for evaluation of the quantitative complement-fixation reactions and reactions ratios. *J. Immun.* 38:146-157, 1940.
18. VON KROGH, M. — Ein Versuch zur Stochiometrie der Haemolyse. *Biochem. Ztschr.* 22:131-148, 1909.
19. VON KROGH, M. — Colloidal Chemistry and Immunology. *J. Infect. Dis.* 19:452-477, 1916.
20. WADSWORTH, A. B.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. *J. Immun.* 21: 313-340, 1931.
21. WADSWORTH, A. B.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantitative studies of complement-fixation reaction with syphilitic serum and tissue extract: technic of the practical quantitative test. *J. Immun.* 35: 217-234, 1938.

Recebido para publicação em 20/10/1966.