

ESTUDOS SÔBRE A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO EM BRUCELOSE

II — Os tipos fundamentais de suas curvas de isofixação

José Oliveira de ALMEIDA (1)

RESUMO

As relações entre sôro bruceloso, antígenos preparados de *B. abortus* e complemento foram estudadas pelo método das curvas isohemolíticas.

Diluições de antígeno eram postas a reagir com o sôro em várias quantidades e com 3 e 6 unidades de complemento. Depois de incubação preliminar de 90 minutos a 37°C, hemácias sensibilizadas foram juntadas e os graus de hemólise obtidos foram lidos em fotocolorímetro. Os tubos apresentando 50% de hemólise, indicavam as quantidades de sôro e de antígeno, capazes de deixar livre uma unidade de complemento, depois do período de fixação. Quando êste grau de hemólise não era obtido diretamente, calculavam-se pelas hemólises parciais observadas, as quantidades de sôro ou de antígeno, que satisfaziam aquela condição.

A projeção das quantidades de sôro em ordenadas, contra as quantidades de antígeno em abcissas, determinava pontos sôbre uma curva de isofixação.

Curvas de isofixação do tipo I foram observadas com os soros de 15 coelhos imunizados, com o sôro padrão internacional e em 3 soros humanos, de um total de 33, em reações com antígeno total de brucelas.

Com êste antígeno, 24 soros humanos (de um total de 33), apresentaram o tipo II de isofixação. A inibição da reação por excesso de sôro (isofixação do tipo IV), foi observada em 3 casos humanos. Outros 3 soros humanos apresentaram reações que eram inibidas por excesso de sôro e por excesso de antígeno (tipo V de isofixação).

Com o antígeno de BOIVIN o tipo II de isofixação foi observado em 30 dos 49 soros experimentados. Todos os soros de coelho apresentaram o tipo I, enquanto 2 soros humanos o tipo IV, e apenas um, o tipo V.

O tipo fundamental de isofixação para o sistema bruceLOSE é o do tipo II para os soros humanos e do tipo I para soros de coelhos.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior ALMEIDA², descreveu três curvas fundamentais de isofixação do complemento. O tipo I caracterizava-se por ter os dois ramos da curva, assintóticos aos eixos das coordenadas. O tipo II tinha o ramo vertical assintótico ao eixo do sôro, ao passo que o outro ramo apresentava uma

inclinação positiva em relação ao eixo do antígeno. O tipo III tinha propriedades dos dois sistemas antes descritos, pois havia uma inflexão do ramo oblíquo ascendente para torná-lo paralelo ao eixo das abcissas. Em todos os três tipos o ramo vertical da curva era paralela ao eixo do sôro.

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

No sistema brucelose o ramo vertical da curva de isofixação pode não ser paralelo ao eixo do soro, indicando a ação inibidora deste, sobre a formação do complexo imune, por ser solúvel em excesso de soro. O ramo horizontal da curva continua paralelo ao eixo das abscissas, caracterizando o tipo IV da curva de isofixação, ALMEIDA ⁴.

Quando o complexo imune é também solúvel em excesso de antígeno, a curva se apresenta em V, e quando há inibição do soro, define o tipo V de isofixação, ALMEIDA ⁴.

Um soro bovino de animal bruceloso apresentou uma reação paradoxal, caracterizada pelo cruzamento das curvas isohemolíticas de 3 e 6 unidades de complemento.

Reações paradoxais tinham sido descritas anteriormente, ALMEIDA ³ no sistema lepra. As relações quantitativas entre soro, antígeno e complemento podiam ser representadas por um sólido, cuja superfície isohemolítica sofria uma torção na zona em que antígeno estava em excesso.

Esta investigação foi feita para determinar os tipos de curvas de isofixação no sistema brucelose. Foram empregados antígenos preparados de *B. abortus* e soros humanos de pacientes com brucelose, soros de animais inoculados e o soro padrão internacional anti-*B. abortus*.

A maioria das curvas de isofixação é a do tipo II, para soros humanos e a do tipo I para soros de coelhos.

A diversidade de tipos nas curvas de isofixação no sistema brucelose, obriga o uso de técnicas apropriadas para cada caso, na determinação do título do soro ou do antígeno.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Soros empregados

Os soros empregados na presente investigação foram os seguintes:

a) Soro padrão internacional anti-*B. abortus*

O soro internacional foi fornecido, por gentileza do Dr. A. W. Stableforth, pelo Laboratório Veterinário do Ministério da Agricultura e Pesca, de Weybridge, Inglaterra.

Cada ampola continha 0,091 g de soro liofilizado, contendo 1.000 Unidades Internacionais, STABLEFORTH ²³.

O soro era reconstituído com água destilada e então inativado a 56°C por 30 minutos. Na feitura das reações, o soro era diluído em solução salina boratada, WADSWORTH ²⁹.

- b) Soros de 15 coelhos inoculados com suspensão de *B. abortus*.
- c) Soros humanos de casos de brucelose, gentilmente cedidos pelo Prof. Villa-fañe Lastre, de Córdoba, Argentina.
- d) Dezoito soros humanos reagentes, em provas de aglutinação e de fixação do complemento, com antígeno de brucela (THIAGO DE MELLO ²⁵).

2) Antígenos

a) Antígeno total de *Brucella abortus*

É a suspensão de *Brucella abortus* B-99-2252, lote n.º 127, preparada pelo Dr. Genésio Pacheco, do Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro. A suspensão espessa foi diluída em solução salina boratada, de forma a dar um índice de 100, no nefelômetro de E.E.L. Ajustada a diluição da suspensão, juntou-se "mertiolato" para uma concentração final de 1:10.000.

b) Antígeno de BOIVIN

Este antígeno foi preparado de acordo com as especificações de BOIVIN & MESROBEANU ⁸, como empregadas por PIROSKY & col. ¹⁹. A suspensão de brucelas era centrifugada em SERVALL SS-1 a 15.000 rotações por minuto, durante 20 minutos, e o sedimento ressuspensão em solução N/4 de ácido tricloroacético. A extração se fez por 18 horas em geladeira, com freqüente agitação. Então, por centrifugação, o sobrenadante opalescente foi colhido, a extração com o ácido repetida por mais 3 vezes. Os sobrenadantes foram misturados e dializados em água corrente por 10 horas e em seguida por mais 72 horas em água destilada, com trocas freqüentes, em geladeira. O dializado, de pH 6,8 foi distribuído em ampolas de 10 ml para liofilização. Obteve-se um rendimento de 0,119 mg para cada

100 ml da suspensão de brucelas, ajustada para um índice nefelométrico de 100. O antígeno de BOIVIN foi diluído em salina boratada, na proporção de 1 mg por ml. A solução resultante era ligeiramente opalescente, tendo-se mantido perfeitamente bem, sem apresentar depósito, quando guardada a 3°C.

c) *Brucelas extraídas*

O sedimento de brucelas extraídas pelo ácido tricloroacético foi repetidamente lavado em solução fisiológica, depois de neutralizado por NaHO N/1. A suspensão foi então ajustada para ter o mesmo grau nefelométrico do preparado original. A suspensão foi juntado mertiolato para uma concentração de 1:10.000.

3) *Complemento*

Soros de sangues colhidos por punção cardíaca de cobaias foram misturados e liofilizados em aparelho EDWARDS modelo 30P1/574. A secagem final foi feita em anidrido fosfórico, no aparelho modelo 30S1.

A homogeneidade do complemento foi assegurada pelo grande número de animais sangrados, tornando então desnecessárias as provas individuais de atividade hemolítica e reatividade não específica, recomendadas por WADSWORTH & col.³⁰

O complemento liofilizado em ampolas de 5 ml e fechadas a vácuo, era reconstituído com água destilada, ao seu volume original. Depois de reconstituído era preservado pelo método de RICHARDSON²². O complemento assim preservado mantém duas propriedades hemolíticas e de fixabilidade, inalteradas, pelo menos por cinco semanas, quando mantido em temperatura de 3-6°C.

Todos os sais utilizados nas soluções preservativas de complemento e nos diluentes devem ser de grande pureza, não podendo conter zinco, que reduz a atividade hemolítica do complemento.

Traços de zinco podem ser evidenciados pela turvação produzida pela adição de uma solução recentemente preparada de dietil-ditiocarbonato de sódio, WILKINSON³².

O complemento foi dosado em presença de hemácias máximamente sensibilizadas, medindo-se o grau de hemólise, fotométricamente,

produzido pelas diferentes quantidades de complemento, depois de incubação de 30 minutos a 37°C. Complemento, em diluição em solução de cloreto de sódio a 0,85%, foi distribuído em tubos previamente selecionados, de 12 x 75 mm. As quantidades de soro de cobaia variavam de 0,00050 ml a 0,00250 ml, em série aritmética, de razão 0,00025, ALMEIDA¹. O volume era completado para 0,3 ml e 0,2 ml de hemácias sensibilizadas eram juntados. Depois de 30 minutos a 37°C juntava-se a cada tubo 0,5 ml de solução fisiológica para completar o volume de 1 ml. Os tubos depois de centrifugados eram levados ao fotômetro para leitura do grau de hemólise.

Projetava-se então cada quantidade de complemento contra a hemólise resultante correspondente, em papel logaritmo-logito. Pelos pontos, traçava-se uma linha de regressão e por meio dela determinava-se graficamente, a quantidade de complemento necessário para 50% de hemólise (K'_0) e a inclinação da linha (h_0), ALMEIDA¹.

Os valores achados para a unidade de complemento (K_0), definida como o volume de soro de cobaia necessário para 50% de hemólise, variavam de 0,00100 ml a 0,00175 ml. A inclinação da linha de regressão, logaritmo de complemento, logito de hemólise, tinha um valor de $0,2 \pm 0,02$ (VON KROGH²⁸).

Uma vez dosado o complemento, eram preparadas soluções para conter em 0,1 ml 3 e 6 unidades. As soluções de complemento eram preparadas no dia em que tinham que ser usadas e eram mantidas sempre em frascos mergulhados em gelo picado.

4) *Hemolisina anti-carneiro*

A hemolisina anti-carneiro foi preparada em coelhos, inoculados com soro de carneiro e hemácias, de acordo com o método de ULRICH & McARTHUR²⁷. Os coelhos foram sangrados cinco dias depois da última inoculação. O soro foi inativado a 56°C por 30 minutos e um volume igual de glicina neutra foi juntado, para conservação.

A hemolisina é titulada em presença de aproximadamente uma unidade de complemento. Procura-se então achar qual a diluição de hemolisina que sensibiliza "ótima-mente" os glóbulos, tornando-os pouco sen-

síveis a ulterior crescimento de hemólise na¹. Nessas condições a hemólise dependeria da quantidade de complemento presente. Uma vez achada a dose de sensibilização ótima, não haverá necessidade de titular a hemolisina, uma vez que ela se mantém por vários anos, sem nenhuma alteração.

Na sensibilização dos glóbulos, verte-se um volume da solução de hemolisina sobre um volume de hemácias de carneiro, passando a mistura de um copo a outro, várias vezes. Sensibilizados, os glóbulos são empregados dentro de uma hora, tendo-se sempre o cuidado de ressuspendê-los, por agitação.

5) Hemácias de carneiro

O sangue, de carneiros sadios, foi colhido em solução glucosada-citratada, BUKANTS & col.¹⁰ e deixado em geladeira, por 4 dias. Então foi distribuído em tubos estéreis, devidamente etiquetados.

Foram sangrados de 3 a 5 animais, pois suspensões de glóbulos, preparadas de vários carneiros, tornam as dosagens de complemento mais regulares do que quando feitas com hemácias provenientes de um único animal, MURASCHI & TOMPKINS¹⁸.

A suspensão de hemácias, é preparada de sedimentos lavados em solução salina a 0,85% de cloreto de sódio, numa concentração aproximada de 5%. A suspensão é sempre ajustada pela determinação da densidade ótica da diluição de uma alíquota a 1/10 em água destilada. Com o fotômetro E.E.L., adaptado para usar tubos de 12 × 75 mm e ler volume de 1 ml, e ajustado a zero, com água destilada, a densidade ótica deve ser de 0,56, em comprimento de onda de 550 m μ (filtro verde) ALMEIDA¹. A suspensão de glóbulos era preparada no dia em que devia ser usada.

6) Diluente

Foi empregada a solução salina de cloreto de sódio tamponada com borato, de pH 7,6-7,8, segundo WADSWORTH²⁹, de preferência a outros diluentes aconselhados, contendo íônios magnésio. A ativação do complemento pelo magnésio, obriga o uso de maior quantidade (em unidades) de complemento, não trazendo nenhuma vanta-

gem, quanto à sensibilidade da reação, MAL-TANER & ALMEIDA¹⁶.

Os antígenos, complemento, hemolisina, glóbulos de carneiro, sôro anti-*B. abortus*, foram diluídos em solução salina boratada, isenta de magnésio.

Os antígenos e o sôro anti-brucela foram diluídos em série geométrica, de razão 2, pipetando um volume deles sobre um volume de diluente. A mistura é passada a outro tubo, volume a volume e assim por diante. O sôro padrão internacional foi diluído, em série de razão 0,67, utilizando-se o método seguinte: 9,0 ml da diluição a 1:10 de sôro padrão internacional anti-*Bruccella abortus*, foram postos em um frasco de base quadrada, que por rotação permite melhor mistura. Então 3 ml foram retirados, com pipeta volumétrica, para um primeiro tubo, e imediatamente substituídos por 3 ml de solução salina boratada. O frasco era girado, inclinado, por 25 vezes, para perfeita mistura e de novo 3 ml eram retirados para um segundo tubo e, então, substituídos por igual volume de diluente. Dessa forma, repetindo-se a operação, foram preparadas as seguintes diluições de sôro: 1:10, 1:15, 1:22,5, 1:33,7, 1:50,6, 1:75,9, 1:113,8, 1:170,4, 1:255,9, 1:383,7, 1:575,5, 1:863,0 e 1:1294.

As quantidades de sôro contidas em 0,1 dessas diluições são respectivamente em ml $\times 10^{-5}$: 1.000, 666, 444, 297, 198, 132, 88, 59, 39, 26, 17, 12 e 8, aproximadamente.

7) Leitura da hemólise

A leitura da hemólise foi feita pela densidade ótica dos sobrenadantes, dos tubos de reação, depois de centrifugados, em fotocolorímetro E.E.L. adaptado para tubos de 12 × 75 mm e volumes de 1 ml.

O fotômetro era ajustado em zero, com água destilada, com filtro verde, 545 m μ . Como a densidade ótica é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina, a hemólise era calculada por um fator de 1,79 (hemólise % = 1,79 \times D.O.).

8) Nomenclatura empregada

Na exposição e discussão dos resultados foi empregada a notação uniforme proposta por THOMPSON & col.²⁶.

9) Método de isofixação do complemento

O estudo das relações quantitativas entre os elementos da reação foi feito pelo método de isofixação, ALMEIDA², que consiste em fazer reagir diferentes concentrações de antígeno com diversas diluições de sôro, sendo mantida constante a quantidade de complemento.

Para a feitura das reações de fixação do complemento em bloco, foram distribuídos os seguintes elementos, na ordem de citação: diluições de sôro 0,1 ml, diluições de antígeno 0,1 ml. Depois de 10 minutos, tendo sido agitados os tubos, distribui-se o complemento, 3 ou 6 unidades, em volume de 0,1 ml.

Contrôles do sôro ou do antígeno foram feitos, distribuindo 0,1 ml do elemento (sôro ou antígeno), 0,1 ml de solução salina tampoadada e 0,1 ml da solução de complemento, contendo 3 unidades.

Os tubos foram incubados a 37°C, em banho-maria por 90 minutos, e então 0,2 ml de hemácias de carneiro, òtimamente sensibilizadas foram distribuídos aos tubos de reação. Os tubos contrôles eram desdobrados, distribuindo 0,2 ml da mistura a um segundo tubo. Completava-se o volume de 0,3 ml, juntando-se ao primeiro tubo 0,2 ml de solução salina boratada e ao segundo 0,1 ml. Então juntavam-se 0,2 ml de hemácias sensibilizadas. Os contrôles são assim feitos para tornar mínima a deterioração do complemento durante a incubação preliminar, pois já com 3 unidades, o complemento se protege razoavelmente. Então se distribui a mistura reação, para se ter aproximadamente no primeiro tubo 1 unidade e no segundo 2 unidades de complemento.

A incubação secundária se efetua a 37°C por 30 minutos, quando então se junta a cada tubo 0,5 ml de solução salina, para completar o volume de 1 ml. Centrifugados durante 5 minutos a 2.000 r.p.m., os tubos podem ser levados ao foto-colorímetro para leitura da densidade ótica do sobrenadante e avaliação do grau de hemólise. Então anotamos, depois de completada a reação e lidas as hemólises, quais as quantidades de antígeno e as de sôro, que foram postas naqueles tubos em que a hemólise foi de 50%. Quando 50% de hemólise não era observada, calculava-se, pe-

las hemólises parciais, qual a quantidade de sôro ou de antígeno, que naquelas condições deixava livre, uma unidade de complemento. O método de calcular baseou-se na relação linear entre logaritmos de sôro (ou de antígeno) e logitos de hemólise, RAPPORT & GRAF²⁰, podendo-se projetar os dados em papel logístico (n.º 32.450 de Codex Book Co., Norwood, Mass.).

Quando os pontos correspondentes às misturas antígeno-anticorpo, dotadas da mesma capacidade fixadora de complemento, eram projetados em um sistema, tendo por ordenadas as quantidades de sôro e por abcissas as quantidades de antígeno, descreviam uma "curva de isofixação".

Como empregamos neste estudo duas quantidades de complemento, obtivemos duas "curvas isohemolíticas", uma para 3 e outra para 6 unidades de complemento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reações com sôro bovino

O sôro padrão internacional anti-*Brucella abortus* é de origem bovina. Sua reação com o antígeno total de brucelas é apresentada no Quadro I e suas curvas isohemolíticas na Fig. 1.

As curvas isohemolíticas são do tipo I, ALMEIDA², mostrando que os complexos imunes formados são insolúveis tanto em excesso de sôro como em excesso de antígeno. Relações lineares entre o complexo imune e complemento podem ser estabelecidas, tanto em termos de antígeno (dosagem de antígeno) como em termos de sôro (dosagem do sôro) (RICE²¹):

$$T_A = \frac{\Delta K'_{s,A}}{\Delta A} \text{ e } T_S = \frac{\Delta K'_{s,A}}{\Delta S}$$

onde T_A = título do antígeno; $K'_{s,A}$ = unidades de complemento necessárias para 50% de hemólise, depois que sôro e antígeno são incubados; A = ml de antígeno; T_S = título do sôro; S = ml de sôro.

O sôro padrão internacional foi utilizado na padronização de antígenos por BÜRKI²¹ e por ALTON & JONES⁶, que empregaram uma única dose de complemento, em rea-

QUADRO I

Reações com antígeno total de *Brucella abortus* e soro padrão internacional anti-*B. abortus* com 3 e 6 unidades de complemento

Soro padrão Internacional		Antígeno total de <i>B. abortus</i> diluído a 1:										Contrôle do soro diluído		
		5.120	2.560	1.280	640	320	160	80	40	20				
		ml × 10 ⁻⁵ de antígeno em 0,1 ml												
Diluição 1:	ml × 10 ⁻⁵ em 0,1 ml	2	4	8	16	31	62	125	250	500				
		% hemólise em reações com 3 unidades de complemento										1U	2U	
10	1.000	90	70	20	0	0	0	0	0	0	35	75		
15	666	90	50	10	0	0	0	0	0	0				
22,5	444	70	45	10	0	0	0	0	0	0				
33,7	297	65	35	5	0	0	0	0	0	0				
50,6	198	65	35	5	0	0	0	0	0	5				
75,9	132	85	25	5	0	0	0	0	5	10				
113,8	88	80	25	5	0	0	0	10	15	30				
170,7	59	90	30	5	5	5	10	20	30	40				
255,9	39	60	50	40	25	40	55	55	55	50				
383,7	26	80	55	55	45	55	70	65	70	55				
575,5	17	90	80	70	75	75	85	75	75	70				
863	12	100	100	100	90	80	90	90	85	80				
		% hemólise em reações com 6 unidades de complemento												
10	1.000			100	60	0	0	0	0	0				
15	666			100	60	0	0	0	0	0				
22,5	444			100	60	10	0	0	0	0				
33,7	297			100	60	10	0	0	5	10				
50,6	198			100	80	30	10	10	25	25				
75,9	132			100	80	55	35	30	40	50				
113,8	88			100	100	80	60	60	60	60				
170,7	59			100	100	90	85	80	80	65				
255,9	39			100	100	80	80	80	80	80				
383,7	26			100	100	90	90	85	85	80				
Contrôle do antígeno														
1U		30	35	35	30	25	25	25	20	5				
2U		75	75	75	75	60	75	75	60	30				
Contrôle do complemento														
1U		35-35										0-0		
2U		75-75										0-0		

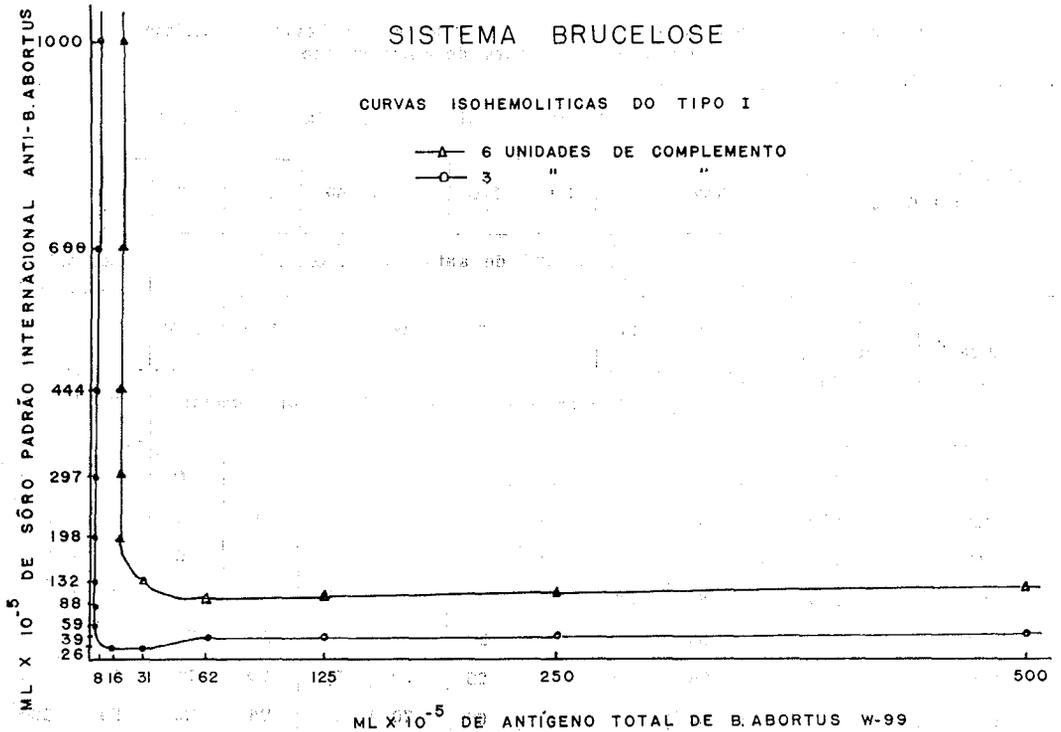


Fig. 1 — O soro padrão internacional anti-*Brucella abortus* reage com o antígeno total de brucelas, dando curvas isohemolíticas do tipo I.

ções em bloco. Recomendam esses Autores a seleção de um outro soro bruceloso que viria substituir o soro padrão internacional na rotina do laboratório. A técnica que esses Autores empregaram, baseava-se na observação de reações entre várias diluições de antígeno total de brucelas e diluições de soro bovino (soro padrão internacional), em presença de uma única dose de complemento.

Quando se empregam duas doses de complemento, pode-se perfeitamente evidenciar o comportamento anômalo de certos soros bovinos, de brucelose, como mostra o Quadro II e Fig. 2.

Cada uma das curvas de isofixação pertence também ao tipo I, mas observa-se que há um cruzamento da curva de 6 unidades de complemento, que vai interceptar a curva de 3 unidades, ficando abaixo dela.

Esse comportamento caracteriza uma "reação paradoxal de fixação do complemento", ALMEIDA³, cuja interpretação poderá ser feita, se considerar-se que o gráfico da Fig. 2 nada mais é que uma representação plana de um sólido que tem por eixos as

quantidades de soro (eixo vertical), as quantidades de antígeno (eixo horizontal) e as quantidades de complemento (eixo perpendicular ao plano). A superfície delimitada pelas quantidades de complemento empregadas, é realmente uma *superfície isohemolítica* e que normalmente tem sua inclinação constante, depois de um certa dose de antígeno. No caso da *reação paradoxal* essa superfície sofre *uma torção* tipo MOEBIUS com inversão da inclinação. Então, podemos imediatamente inferir as consequências advindas dessa torção, pois, como mostra a Fig. 2, o ponto de torção ou cruzamento das duas curvas isohemolíticas corresponderia à mistura soro-antígeno, capaz de fixar 2 unidades, quando 3 estavam presentes ou, então, 5, quando a reação era feita com 6 unidades. Se o título do soro é computado como a relação entre acréscimo de complemento e acréscimo de soro, RICE²¹,

$$T_s = \frac{\Delta K'_{s,A}}{\Delta S}$$

QUADRO II

Reações com antígeno total de *Brucella abortus* e soro bovino (Bruceloso) com 3 e 6 unidades de complemento

Soro bovino (Bruceloso) n.º 660.213		Antígeno total de <i>B. abortus</i> diluído a 1:								Contrôle do soro diluído			
		1.280	640	320	160	80	40	20	10				
Diluição 1:	ml × 10 ⁻⁵ em 0,1 ml	ml × 10 ⁻⁵ de antígeno em 0,1 ml											
		8	16	31	62	125	250	500	1.000	1U	2U		
		% hemólise em reações com 3 U. de complemento								1U	2U		
10	1.000	85	70	15	0	0	0	0	0	35	100		
20	500	85	50	5	0	0	0	0	0	45	100		
40	250	85	40	0	0	0	0	0	0	45	100		
80	125	85	30	0	0	0	0	0	0	50	100		
160	62	85	20	10	10	10	10	10	10	50	100		
320	31	75	15	10	25	20	30	30	30	50	100		
640	16	80	75	70	65	70	75	75	75	50	100		
1.280	8	100	100	100	90	90	90	90	90	50	100		
		% hemólise em reações com 6 U. de complemento											
10	1.000	100	100	90	35	0	0	0	0				
20	500	100	100	85	25	0	0	0	0				
40	250		100	95	30	0	0	0	0				
80	125			95	45	0	0	0	0				
160	62			100	85	15	10	10	10				
320	31			100	90	35	30	25	25				
640	16			100	90	50	40	40	40				
1.280	8			100	100	70	65	65	70				
2.560	4			100	100	85	85	85	90				
Contrôle do antígeno													
		1U	50	45	50	50	45	45	40	35			
		2U	100	100	100	100	100	100	95	90			
Contrôle do complemento													
		1U	40-40									Contrôle de hemácias sensibilizadas 0-0	
		2U	100-100										

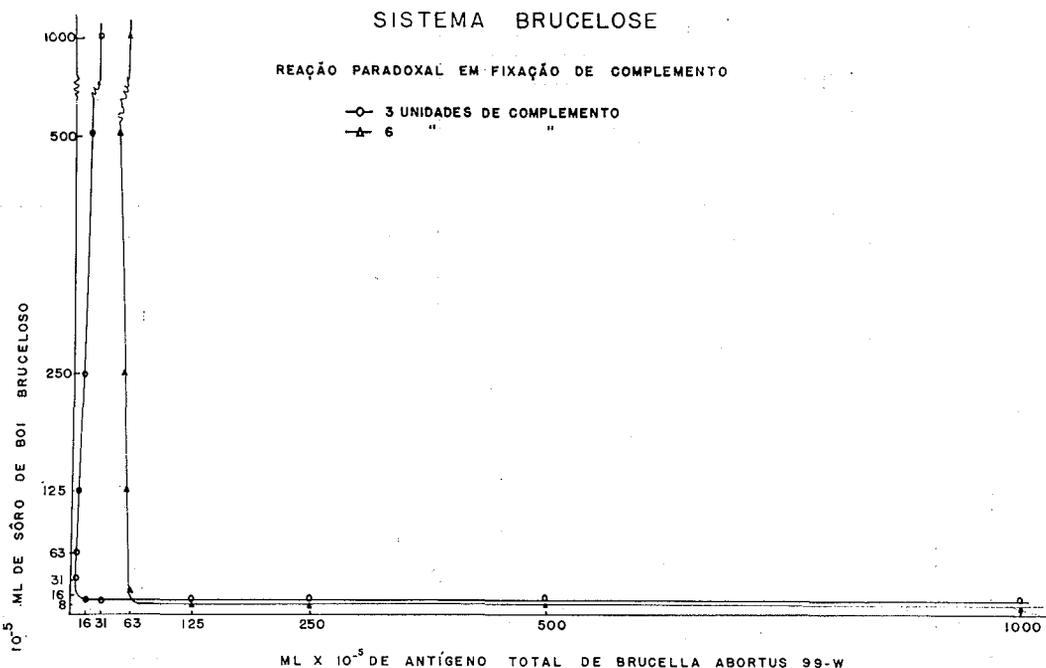


Fig. 2 — O sôro padrão internacional anti-*Brucella abortus* reage com o antígeno de BOIVIN de brucelas, dando curvas isohemolíticas do tipo II.

a sua determinação nesse ponto teria sido impossível, por ter um *valor infinito*. Com maiores doses de antígeno, o título teria um *valor negativo*, devido à inversão da inclinação da superfície isohemolítica.

O comportamento anômalo de certos soros brucelosos, com maiores doses de complemento foi também assinalado por BÜRKI¹¹, que observou fenômenos de prozona, quando eram empregadas 8 unidades de complemento, mas não com 6 unidades. Com o nome de "fenômeno paradoxal" BOERNER & STUBBS⁷ descreveram o comportamento de certos soros em brucelose, que fixava mais complemento, quando era mais diluído. Verificaram que mesmo com extratos de brucelas, as reações de fixação do complemento, podiam ser inibidas por excesso de antígeno. A inibição da reação por alguns soros de boi não teria relação com a concentração dos anticorpos anti-brucelas, SURFACE²⁴, podendo haver diluições de sôro bovino, em que as reações de aglutinação contradiziam as de fixação do complemento, MITCHELL¹⁷.

Embora essas observações tenham sido feitas, pelos citados Autores, não se podia apreciar o fenômeno da maneira objetiva, como é feita através a projeção das curvas isohemolíticas. Por êsse método, ALMEIDA², pode-se inferir imediatamente as propriedades do sistema de fixação do complemento entre alguns soros bovinos brucelosos e o antígeno de brucelas.

Por êsse método podemos excluir tal sôro, com reação paradoxal de fixação do complemento, como impróprio para aferir os antígenos preparados de *Brucella abortus*.

Estudando as reações obtidas com o antígeno de BOIVIN, cujos resultados são apresentados no Quadro III, verifica-se que o sôro padrão internacional apresenta curvas isohemolíticas do tipo V, com inibição por excesso de sôro e por excesso de antígeno.

A determinação do título do sôro internacional, na zona em que antígeno está em excesso, mostra haver dependência da quantidade de antígeno presente na reação. Assim, para maiores doses de antígeno, as linhas isohemolíticas se afastam uma da outra, abrindo-se, divergindo, influenciando de-

QUADRO III

Reações com antígeno de Boivin e soro padrão internacional anti-B. *abortus* com 3 e 6 unidades de complemento

Soro padrão Internacional		Antígeno de Boivin diluído a 1:											Contrôle do soro diluído	
		10.240	5.120	2.560	1.280	640	320	160	80	40	20	10		
ml $\times 10^{-5}$ de antígeno em 0,1 ml														
Diluição 1:	ml $\times 10^{-5}$ em 0,1 ml	1	2	4	8	16	31	62	125	250	500	1.000		
		% hemólise em reações com 3 U. de complemento											1U	2U
10	1.000	65	50	25	0	0	0	0	0	0	0	0	35	100
20	500	70	35	5	0	0	0	0	0	0	0	0	45	100
40	250	60	20	0	0	0	0	0	0	0	10	25	45	100
80	125	65	25	0	0	0	0	0	0	20	40	70	50	100
160	62	85	50	15	5	10	10	25	50	80	90	100	50	100
320	31		85	60	55	65	80	90	100	100	100	100	50	100
		% hemólise em reações com 6 U. de complemento												
10	1.000			95	55	0	0	0	0	0	0	0		
20	500			80	30	0	0	0	0	0	10	50		
40	250			70	30	10	0	0	10	35	65	85		
80	125			95	70	50	45	70	80	95	90	95		
160	62			100	100	100	100	100	100	100	100	100		
Contrôle do antígeno														
1U		45	45	50	50	45	50	50	45	45	40	35		
2U		100	100	100	100	100	100	100	100	100	95	90		
Contrôle do complemento		Contrôle de hemácias sensibilizadas 0-0												
1U 40-40														
2U 100-100														

QUADRO IV

Cálculo do título do soro padrão Internacional anti-*Brucella abortus* em reações de fixação do complemento com 3 e 6 unidades de complemento e com várias diluições de antígeno de Boivin de *B. abortus* (Dados do Quadro III)

Antígeno diluição	Soro diluição	Hemólise (%) 3 U	$K'_{S,A}$	Soro diluição	Hemólise (%) 6 U	$K'_{S,A}$	Título $\Delta K'_{S,A} / \Delta S$
1:10	1:80	70	2,52	1:20	50	6,00	93
1:20	1:80	40	3,24	1:40	65	5,28	163
1:40	1:80	20	3,88	1:40	35	6,74	229
1:80	1:160	50	3,00	1:80	80	3,84	243
1:160	1:160	25	3,69	1:80	65	5,28	254
1:320	1:160	10	4,56	1:80	45	6,20	262
1:640	1:320	65	2,64	1:80	45	6,20	325
1:1280	1:320	55	2,86				
1:320				1:80	45	6,20	356

$K'_{S,A}$ calculado de acordo com a relação de Von Krogh²⁸ para $h_{S,A} = 0,2$

cisivamente sobre o valor do título, como mostra o Quadro IV.

Aqui também não existem condições de paralelismo entre as curvas isohemolíticas, não permitindo a determinação do título do soro, independente da concentração de antígeno, ALMEIDA².

Os ramos verticais das curvas isohemolíticas das reações com antígeno de BOIVIN (Fig. 3), mostram a mesma tendência de se afastar uma da outra, quando maiores quantidades de soro são empregadas (Quadro V). Aqui também faltam condições de paralelismo para a determinação do título do antígeno, em excesso de soro, como é desejável, ALMEIDA². Poder-se-ia então determinar o título do antígeno pelas reações de máxima intensidade e nesse caso o título do antígeno seria de 8.028.

É aqui pertinente dizer que o título do antígeno não indica a dose a ser empregada na reação, mas significa a relação linear entre antígeno e complemento. No caso do antígeno de BOIVIN e soro padrão internacional, a curva de isofixação de 3 unidades de complemento, mostra nitidamente dois pontos de máxima reatividade. Um deles corresponde à quantidade de soro (1:80), capaz de evidenciar a menor quantidade de antígeno (1:10.240). O outro, é a quantidade de antígeno (1:1.280) capaz de reagir com a menor quantidade de soro (1:320). O mesmo fenômeno se observa com a curva de isofixação para 6 unidades de complemento.

Curvas desse tipo foram descritas em flocação por BOYD⁹ como dependentes da qualidade do anticorpo, chamando-as de tipo H por tê-las encontrado em soros imunes de cavalo. Outras com um único ponto de inflexão, seriam próprias de reações com

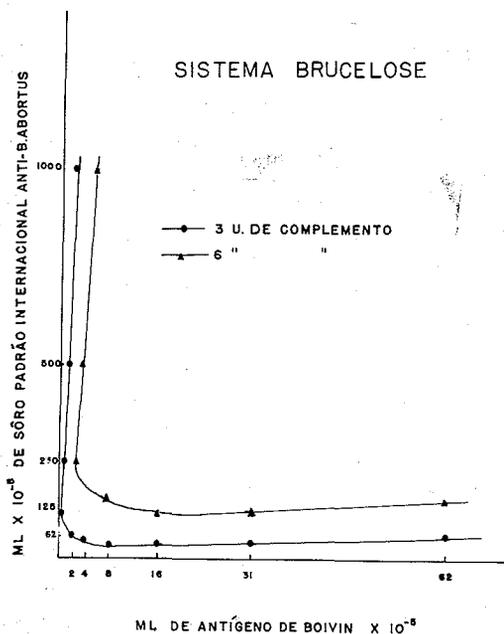


Fig. 3 — A reação paradoxal de fixação do complemento observada em um soro de boi bruceloso caracteriza-se pela inversão da posição das suas curvas isohemolíticas, na zona em que há excesso de antígeno.

QUADRO V

Determinação do título do antígeno de Boivin, com o soro padrão Internacional anti-*Brucella abortus* e 3 e 6 unidades de complemento (Dados do Quadro III)

Soro diluído	6 unidades de complemento			3 unidades de complemento			$\Delta K'_{S,A}$	ΔA	Título
	y%	$K'_{S,A}$	A	y%	$K'_{S,A}$	A			
1:10	55%	5,72	1:1.280	50%	3,00	1:5.120	2,72	1:1.706	4.651
1:20	30%	7,04	1:1.280	35%	3,37	1:5.120	3,67	1:1.706	6.276
1:40	30%	7,04	1:1.280	60%	2,75	1:10.240	4,29	1:1.872	8.028

y% = hemólise %. $K'_{S,A}$ Unidades de complemento necessárias para 50% de hemólise
A = antígeno

soro de coelho, e daí o nome de R. Ambos os tipos de curvas podem ser encontrados em soro humano, na dependência do antígeno empregado, ALMEIDA⁴.

O uso de maiores doses de antígeno, para evitar reações zonais, como recomendam HAJDU¹⁴ e BÜRKI^{11,12} iria, portanto, influenciar o valor do título do soro. Verificamos também que se tal critério fôsse adotado na determinação do título do antígeno,

usando excesso de soro, a mesma deformação seria observada.

A falta de paralelismo entre as curvas isohemolíticas das reações de fixação do complemento com o soro padrão internacional e antígeno de BOIVIN, não propicia as condições necessárias para a determinação do título do complexo imune, tanto em termos de soro (título do soro) como em termos de antígeno (título do antígeno).

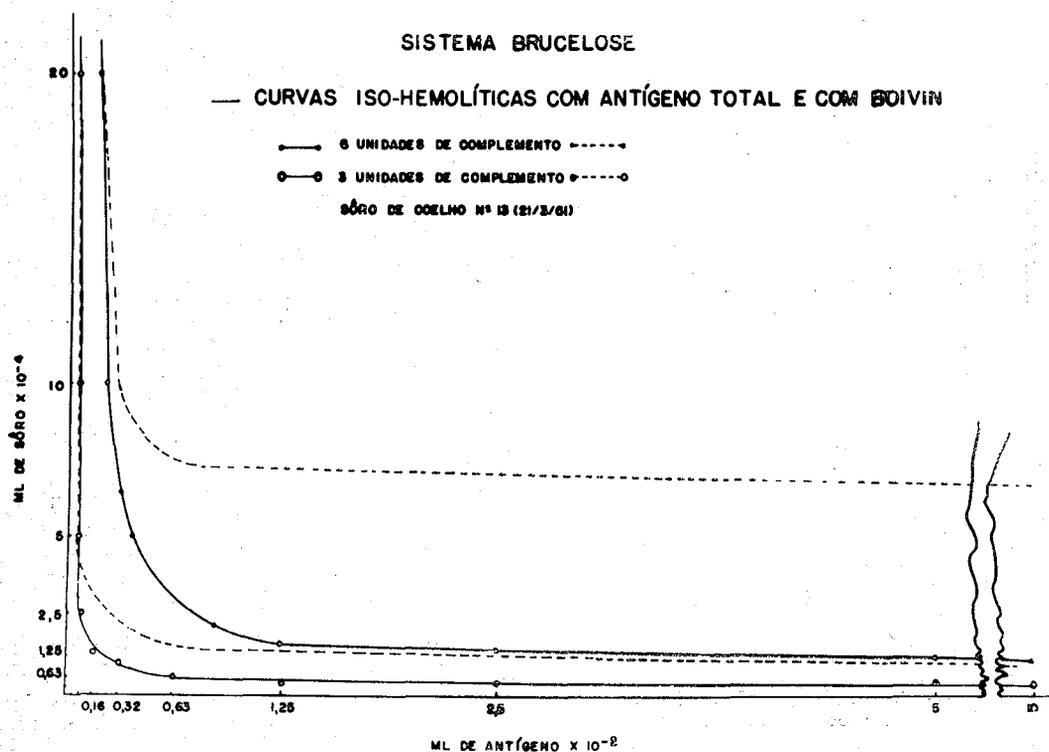


Fig. 4 — Soros de coelhos imunizados reagem com o antígeno total ou com o antígeno de BOIVIN, de *Brucella abortus*, dando o tipo I de curvas isohemolíticas.

Reações com soro de coelho

Soros de coelhos imunizados com antígenos preparados de *Brucella abortus* apresentaram consistentemente o tipo I de isofixação, quer com antígeno total, quer com antígeno de BOIVIN (Fig. 4).

A reação com antígeno total é de maior intensidade, que a reação com antígeno de BOIVIN, como mostra a Fig. 4, onde estão computados os títulos do soro determinados com um e outro antígeno.

Foram levantadas as curvas isohemolíticas dos soros dos 15 coelhos imunizados com os seguintes antígenos: antígeno total de *B. abortus*, antígeno de brucelas extraídas e antígeno de BOIVIN. Todas as curvas eram do tipo I, não sendo observada qualquer inibição da reação, por excesso de antígeno ou por excesso de soro.

As linhas de isofixação sendo paralelas entre si, quando 3 e 6 unidades de complemento eram empregadas, deram as con-

dições necessárias para a determinação do título do antígeno e do título do soro. Assim, reações com soro de coelhos imunizados, comportaram-se de maneira mais apropriadas, indicando poder ser o soro de referência para a padronização das reações de fixação do complemento em brucelose, tanto para o antígeno total de brucelas como para o antígeno de BOIVIN.

Reações com soro humano

Soros de 15 pacientes com brucelose por *B. abortus*, comprovada bacteriológicamente, apresentaram curvas de isofixação dos tipos I, II, IV e V, ALMEIDA⁵. O tipo predominante foi o II, quando 14 soros reagiram dessa forma com o antígeno de BOIVIN, de um total de 15. Quando o antígeno total de *B. abortus* era empregado, 8 soros apresentaram o tipo II de isofixação, 3 do tipo I, 1 do tipo IV e 3 do tipo V.

As reações do tipo IV e V são apresentadas nas Figs. 5 e 6.

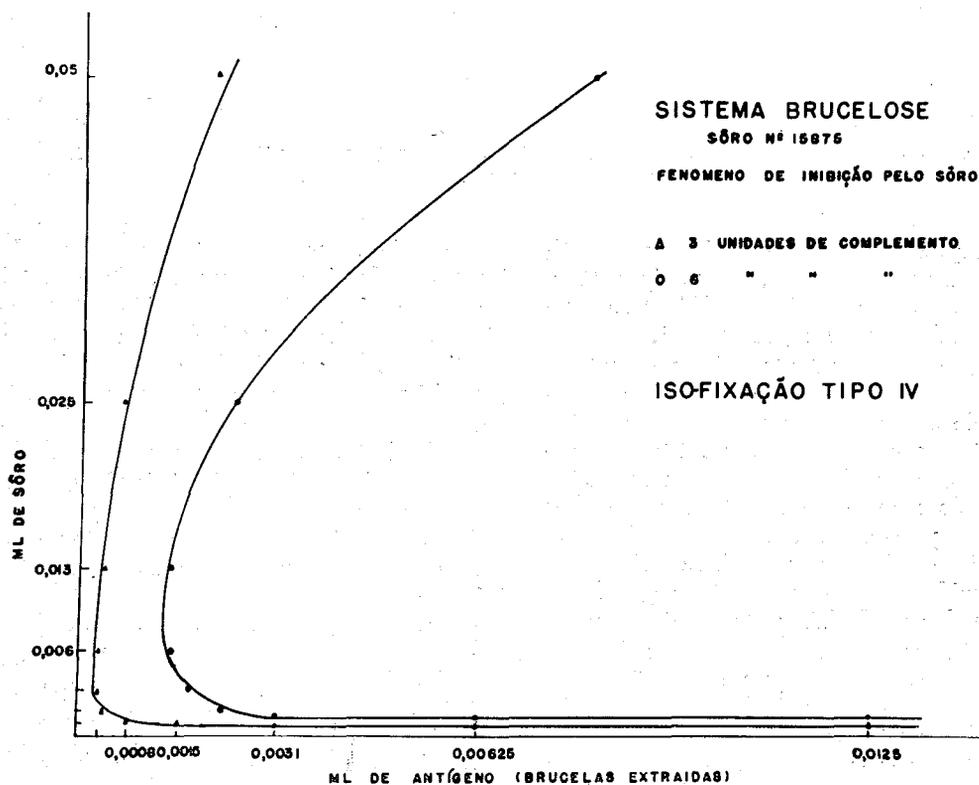


Fig. 5 — A inibição da reação de fixação do complemento pelo soro bruceloso caracteriza o tipo IV de curva de isofixação.

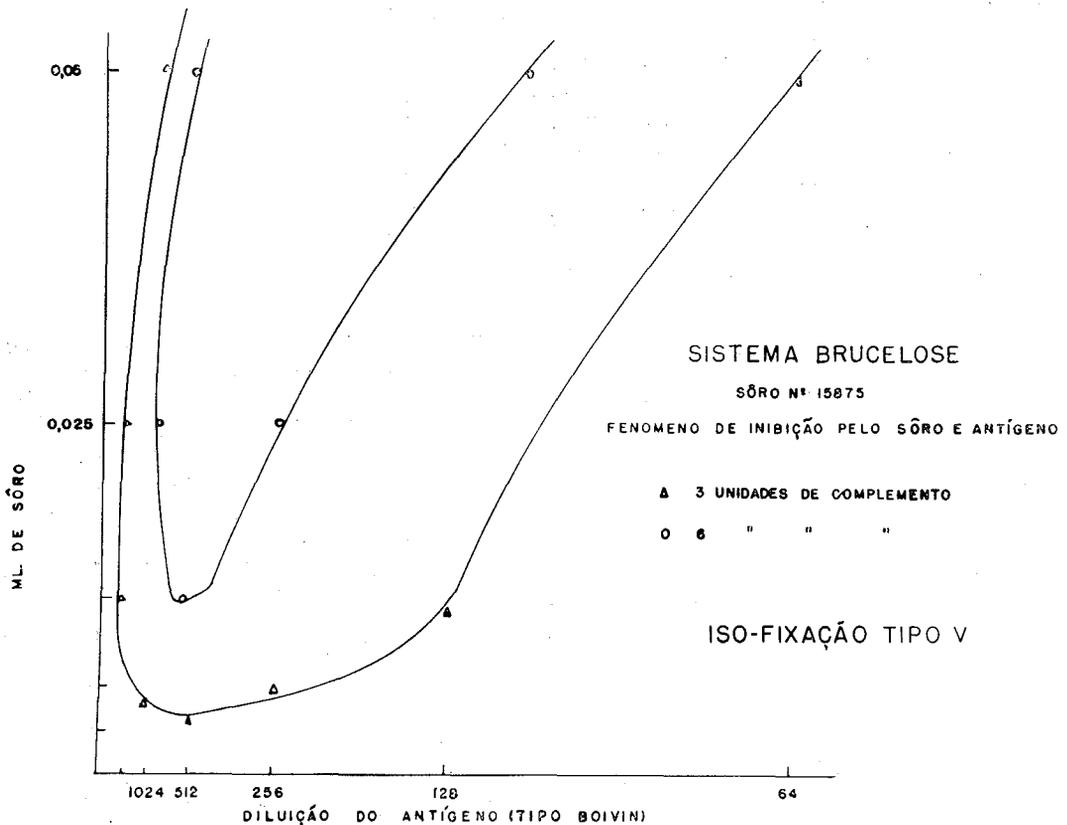


Fig. 6 — A inibição da reação de fixação do complemento pelo antígeno de *B. abortus* e pelo soro bruceloso define o tipo V de curva de isofixação

Condições para a determinação do título do soro ainda existem nos tipos IV e V, quando as curvas isohemolíticas se mostram paralelas entre si, ALMEIDA².

No tipo IV, no entanto, não se encontram as condições de paralelismo entre as curvas isohemolíticas, em excesso de soro. Poder-se-ia, no entanto, avaliar o título do antígeno, tomando as doses de máxima reatividade do soro, e calculando-se o título do antígeno, pelas doses desse, necessárias para a reação de fixação, que ainda deixa livre uma unidade de complemento, seguindo as recomendações de WADSWORTH & col.³¹.

Dezoito soros humanos, selecionados por provas de aglutinação com suspensão de *B. abortus*, segundo os métodos adotados e recomendados pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE^{1,3, 15, 34, 35, 36}, foram experimentados em provas de fixação do complemento, com antígeno total de *Brucella abortus*, antígeno de BOVIN e com brucelas extraídas.

Dezesseis soros apresentaram curvas de isofixação do tipo II, com o antígeno total e com o antígeno de BOVIN. Um soro reagiu com o antígeno total, dando uma curva do tipo IV, evidenciando grande inibição por efeito do soro e nenhuma por antígeno em excesso. Esse mesmo soro, com o antígeno de BOVIN, apresentou o tipo V de isofixação, denunciando inibição da reação, tanto por excesso de soro como por excesso de antígeno. O outro soro apresentou com ambos os antígenos o tipo IV, indicando inibição apenas pelo soro.

É de se notar que um mesmo soro (N.º 15.875) apresentou o tipo IV com antígeno de brucelas extraídas e o tipo V com antígeno de BOVIN.

Dos 33 soros humanos brucelosos, 30 apresentaram curvas de isofixação do tipo II com o antígeno de BOVIN e 24 deles com o antígeno total de *Brucella abortus*.

QUADRO VI

Tipos de curvas de isofixação de complemento no sistema Brucelose

Sôro	Antígeno	Tipos de curvas de isofixação				Total de soros
		Tipo I	Tipo II	Tipo IV	Tipo V	
Bovino. Sôro padrão internacional anti- <i>B. abortus</i>	Total BOVIN	1			1	1
De coelhos imunizados	Total BOVIN	15 15				15
Humano. Brucelose comprovada bacteriológicamente	Total BOVIN	3	8 14	1 1	3	15
Humano. Soros reagentes em fix. compl. e aglutinação	Total BOVIN		16 16	2 1	1	18
Com antígeno total		19	24	3	3	49
Com antígeno de BOVIN		15	30	2	2	49
Com ambos os antígenos		34	54	5	5	98

Os tipos de curvas observados em soros brucelosos estão apresentados no Quadro VI.

A recomendação de STABLEFORTH²³ de se usar o sôro padrão internacional para a padronização de reações de fixação do complemento para brucelose, sofre uma limitação causada pelo tipo de curva de isofixação, do tipo I, com o antígeno total de brucelas. Seria então um sôro padrão para aferir antígenos a serem empregados com sôro de boi ou de coelho imunizado, mas não para a reação a ser empregada com sôro humano, uma vez que o tipo fundamental ou mais comumente encontrado, nesse caso, é o tipo II, mostrando grande inibição por excesso de antígeno.

Assim a recomendação de BÜRKI¹¹ de se usar excesso de antígeno, encontra sua contra-indicação no sistema humano, embora possa ser aceito para soros de boi ou de coelho.

Desde que o tipo II de isofixação é o mais comum entre soros humanos, é obrigatório o emprêgo de uma dose crítica de antígeno, de máxima reatividade para as reações qualitativas, por lhes dar maior sensibilidade.

Para as reações quantitativas, no entanto, se poderá sempre empregar excesso de antígeno, pois em todos os tipos de curvas isohemolíticas, uma vez que exista paralelismo entre elas, poder-se-á determinar o título do complexo imune em termos de sôro, pela relação entre sôro e complemento.

CONCLUSÕES

1.º) A curva do tipo II de isofixação é a mais comum entre soros humanos, reagindo com antígeno total de *B. abortus* e com antígeno de BOVIN. Nesse caso uma dose de antígeno, de máxima reatividade deve ser empregada nas reações qualitativas de fixação do complemento.

2.º) Para as reações quantitativas de fixação de complemento para brucelose, um excesso de antígeno poderá ser empregado, em titulações com 3 e 6 unidades de complemento, desde que o paralelismo entre as curvas isohemolíticas seja observado.

3.º) O sôro padrão internacional anti-*B. abortus*, reage com o antígeno total de

B. abortus, dando uma curva de isofixação do tipo I e com o antígeno de BOIVIN, apresenta o tipo V, não sendo portanto recomendado, para a padronização de antígenos a serem empregados com sôro humano.

4.º) O sôro de coelhos imunizados com *B. abortus* reage com o antígeno total e com o antígeno de BOIVIN, apresentando curvas de isofixação do tipo I.

É então possível a substituição do sôro padrão internacional por sôro de coelho imunizado, em reações com antígeno total de brucelas, uma vez que, em um e outro caso o tipo de isofixação é o mesmo. Tal substituição, no entanto, não poderá ser feita, em reações com o antígeno de BOIVIN.

5.º) Curvas de isofixação devem ser feitas com duas doses de complemento. Dêsse modo evidenciam-se reações *paradoxais*, encontradas entre soros de boi com brucelose e que de outro modo passariam despercebidas. Reações paradoxais se caracterizam pelo cruzamento das suas curvas de isofixação, na zona em que antígeno está mais concentrado.

6.º) Em 50 soros experimentados (2 de boi, 15 de coelho e 33 de homem) com antígeno total de brucela, 20 apresentaram o tipo I de isofixação, 24 o tipo II, 3 o tipo IV e 3 o tipo V. Quando foi empregado o antígeno de BOIVIN, 15 soros reagiram como tipo I, 31 como tipo II, 2 como tipo IV e 2 como V.

7.º) Devido aos vários tipos de curvas isohemolíticas encontradas no sistema brucelose, recomenda-se que os antígenos devam ser experimentados com soros de referência, provenientes de mesma espécie animal, para a determinação de suas doses de máxima reatividade e para se conhecer as condições que vão permitir a determinação dos títulos do sôro e do antígeno.

SUMMARY

Studies on the complement fixation reaction for brucellosis. II — The fundamental types of its isofixation curves.

The relationships between antigens prepared from *Brucella abortus*, and reacting serum were determined by the isofixation

method. Dilutions of antigen were added to varying amounts of serum for reactions with three and six units of complement. After the preliminary incubation at 37°C for minutes, 0.2 ml of maximally sensitized sheep cells were added and the hemolysis was evaluated in the supernates, with the aid of photo-colorimeter, after 30 minutes in water bath at 37°C.

The amounts of antigen and immune-serum present in the tubes showing 50% hemolysis, were plotted, in a coordinate system, with antigen as abscissa and serum as ordinate. When 50% of hemolysis was not obtained the amounts of reagents were calculated by the linear relationship between logarithm of the reagent (serum or antigen) and the logit of hemolysis.

The plotted points described curves of different shapes, which can be classified as follows: no inhibition by serum and antigen, type I; in type II, there is inhibition by antigen excess, but not by the serum; type IV shows inhibition by the serum alone and type V by both, serum and antigen.

When the suspension of *B. abortus* was used as antigen in complement fixation, the type I was observed with the International anti *B. abortus* standard serum, with the immune sera prepared in rabbits (15), and with 3 human sera from bacteriologically proved cases of brucellosis. With this antigen 24 human sera from a total of 33, presented the type II of isofixation curve, 3 the type IV and 3 the type V.

With BOIVIN antigen prepared from *B. abortus*, the international standard serum presented the type V, 30 human sera, from a total of 33 the type II, 2 the type IV and one the type V.

These data pointed out that the most common type of isofixation curve with human sera was type II, with inhibition by antigen excess. The international anti-brucella standard serum and the immune sera from 15 rabbits presented the type I, with no inhibition by serum or by antigen.

Immune sera prepared in rabbits have the same type of isofixation curve observed with the international anti-*Brucella abortus* standard serum, in complement fixation reactions with the total antigen suspension of *B. abortus*. Rabbit immune anti-*Brucella abortus* sera can be used in CF tests instead

of the international standard serum as reference, when the suspension of *B. abortus* is used as antigen. However with the BOVIN antigen, rabbit serum presents the type I whereas the international standard serum the type V, with inhibition by serum and by the antigen.

The diversity of isofixation curves found in the brucellosis system obliges the adjustment of the reaction, with varying dilutions of serum and of antigen, in order to detect the zones of maximal reactivity to permit the evaluation of immune complexes in terms of antigen (antigen titration) or serum (serum titration) by the quantitative complement fixation test.

AGRADECIMENTOS

Apresentamos nossos agradecimentos ao Dr. Stableforth, do Laboratório Central de Veterinária em Weybridge, Inglaterra, pelo fornecimento do sôro padrão internacional anti-*B. abortus*; ao Prof. Dr. Villafañe Lastra, da Faculdade de Medicina da Universidade de Córdoba, Argentina, pelos soros de pacientes brucelosos e aos Srs. Dolando Martorano e Lourival F. Leite, pelo trabalho técnico realizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALMEIDA, J. O. de — Técnica da reação de Wassermann quantitativa. Emprego do colorímetro foto-elétrico na padronização dos reagentes e na leitura da reação. *Hospital (Rio)* 35:847-898, 1950.
2. ALMEIDA, J. O. de — Isofixation curves as a method of standardization of quantitative complement fixation test. *J. Immun.* 76:259-263, 1956.
3. ALMEIDA, J. O. de — Cripto-antigenos e cripto-reações com antigenos de bacilo da tuberculose e soros de leprosos em reações de fixação do complemento. *Ciência e Cultura* 10:71-76, 1958.
4. ALMEIDA, J. O. de — Superfícies isohemolíticas do tipo R e H em reações de fixação de complemento no sistema brucelose. *Rev. Brasil. Microb.* 4:3-12, 1963.
5. ALMEIDA, J. O. de — Reação quantitativa de fixação de complemento em gotas sôbre placas, pelo método das curvas isohemolíticas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:176-189, 1963.
6. ALTON, G. G. & JONES, L. — *Laboratory techniques in Brucellosis. Animal Health Branch Monograph N.º 7, FAO. Rome, 47 pp., 1963.*
7. BOERNER, F. & STUBBS, E. L. — Technic and comparative studies of the agglutination and complement fixation tests for bovine infectious abortus. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 65:425-432, 1924.
8. BOIVIN, A. & MESROBEANU, L. — Contribution à l'étude de la composition chimique des bacteries. Substances azotées et phosphorées acido solubles. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 113:76-79, 1933.
9. BOYD, W. C. — Influence of character of antibody upon velocity of flocculation. *J. Exp. Med.* 74:369-386, 1941.
10. BUKANTS, S. C.; REIN, C. R. & KENT, J. F. — Studies on complement-fixation. 2 — Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (Modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *J. Lab. Clin. Med.* 31:394-399, 1946.
11. BURKI, F. — Über Immunantikörper gegen *Brucella abortus* in Blutserum von Rindern, Möglichkeiten zu ihrem Nachweis und ihre Klinische Bewertung. *Zbl. Vet. Med.* 4:833, 1957.
12. BURKI, F. — Standardisierung der Komplementbindungsreaktion auf Brucellose. *Zbl. Bakt. (Orig.)* 133:225-245, 1961.
13. CASTANEDA, M. R. — Brucellosis. *Prensa Med. Mex. (Ed.)*, 302 pp., 1954.
14. HAJDU, S. — Beitrag zur Methodik und diagnostischen Zuverlässigkeit des Agglutinations- und Komplementfixations — Testes bei Rinder- und Schweine-Brucellose. *Vet. Casopis* 4:283, 1956.
15. JERNE, N. K. — The "unit" in preference to the "titre" as a measure of agglutinating activity. *Bull. W.H.O.* 10:937-940, 1954.
16. MALTANER, F. & ALMEIDA, J. O. de — The parallel effects of magnesium on the complementary and coagulative activities of blood serum. *Blood* 4:728-733, 1949.
17. MITCHELL, C. A. — Bovine infectious abortion and its relation ship to Public Health. *Canad. J. Public Health* 20:78-84, 1929.
18. MURASCHI, T. F. & TOMPKINS, V. N. — Pooled sheep cells for use in the hemolytic system of the complement fixation test. *Amer. J. Clin. Path.* 19:152-155, 1949.
19. PIROSKY, I.; PIROSKY, R. & D'ALESSANDRO, N. V. — El antigeno glúcido-lípido como fijador de complemento. I — En

- Brucella. *Rev. Inst. Bact. Malbran* 10:135-143, 1941.
20. RAPPORT, M. M. & GRAF, L. — Immunochemical analysis based on complement fixation. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 69:608-632, 1957.
21. RICE, C. E. — Some factors influencing the selection of a complement-fixation method. I — A comparison of two quantitative technics, and an alternative method of expressing serum-dilution titer. *J. Immun.* 59:95-105, 1948.
22. RICHARDSON, G. M. — Preservation of liquid complement serum. *Lancet* 2:696-697, 1941.
23. STABLEFORTH, A. W. — The International Standard for anti-*Brucella abortus* serum. *Bull. W.H.O.* 10:927-935, 1954.
24. SURFACE, F. M. — The inhibition effect of excess cow serum in complement fixation with infectious abortion. *Z. Immun. (Orig.)* 17:487-505, 1913.
25. THIAGO DE MELLO, M. — A tetrazolium stained antigen for serum agglutination tests in brucellosis, FAO/WHO Brucellosis Information Series. 41/June, 22, 1951.
26. THOMPSON, W. R.; RICE, C. E.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — Some fundamental notions in estimation of complement fixation. I — General relations and a proposed uniform notation. *J. Immun.* 62:353-361, 1949.
27. ULRICH, C. A. & McARTHUR, F. X. — An improved method for the production of anti-sheep hemolysin. *Amer. J. Clin. Path.* 12:84-85, 1942.
28. VON KROGH, M. — Colloidal Chemistry and Immunology. *J. Infect. Dis.* 19:452-477, 1916.
29. WADSWORTH, A. B. — Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. 3th edition. Baltimore, Williams & Wilkins, pp. 990, 1947.
30. 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.
31. 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.
32. WILKINSON, A. E. — Destructive effect of traces of zinc salts on complement. *J. Clin. Path.* 3:363-366, 1950.
33. WORLD HEALTH ORGANIZATION — *Joint FAO/WHO Expert Panel on Brucellosis. Report on the First Session. Tech. Report Ser. 37.* Genève, 1951, 34 pp.
34. WORLD HEALTH ORGANIZATION — *Comité mixte FAO/OMS D'Experts de la Brucellose. Deuxième Rapport. Serie de Rapports techniques n.º 67.* Genève, 1953, 67 pp.
35. WORLD HEALTH ORGANIZATION — *Expert Committee on Biological Standardization. Sixth Report. Technical Report Series n.º 68.* Geneva, 1953, 26 pp.
36. WORLD HEALTH ORGANIZATION — *Expert Committee on Biological Standardization. Seventh Report. Technical Report Series n.º 86.* Geneva, 1954, 22 pp.

Recebido para publicação em 17/2/1967.