

## CAPACIDADE REATIVA ESPECÍFICA DO ANTÍGENO COM ANTICORPO EM REAÇÕES DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO PARA MOLÉSTIA DE CHAGAS

José Oliveira de ALMEIDA<sup>(1)</sup>, José Lima Pedreira de FREITAS<sup>(2)</sup>  
e Astolpho Ferraz SIQUEIRA<sup>(3)</sup>

### RESUMO

A combinação entre soro chagásico e antígeno preparado com *Trypanosoma cruzi* foi estudada por técnica direta de fixação de complemento, empregando-se o método das curvas iso-hemolíticas.

Várias diluições de complemento foram usadas em reações praticadas com soro chagásico, ora diluído em soro humano normal, ora em solução salina, em presença de quantidades variáveis de antígeno.

As relações lineares entre soro e complemento foram estabelecidas em excesso de antígeno; aquelas entre antígeno e complemento foram determinadas em excesso de soro. Essas relações permitiam calcular a reatividade do soro ou do antígeno em termos de complemento necessário para deixar sempre uma quantidade constante de complemento livre na mistura. A reatividade do complexo imune, em termos de soro ou de antígeno, tem sido expressa pela sua capacidade fixadora de complemento, bastando que um dos elementos esteja em excesso relativo. Essa relação proporcional ou "título por acréscimo" verificou-se depender também das condições da reação, tais como o diluente, a qualidade do complemento e outros fatores não determinados, impedindo sua reprodução. Por outro lado, quando se analisaram essas variações através das curvas iso-hemolíticas, verificou-se que elas se observavam tanto na zona de excesso de soro (portanto na dosagem do antígeno) quanto na de excesso de antígeno (isto é, na dosagem do soro). Como essas variações se davam em um mesmo sentido, havia uma relação constante entre título do antígeno e o do soro, independente das influências das condições em que a reação era praticada e traduzindo uma propriedade do complexo imune formado.

Esse quociente apresentava valores diversos quando um mesmo antígeno reagia com diferentes soros, mesmo quando se mantinham constantes as condições da reação; era, no entanto, de valor constante para amostras de um mesmo soro reagindo com um mesmo antígeno, embora variassem as condições da prova, traduzindo portanto a capacidade reativa específica entre antígeno e anticorpo. Obviamente o conhecimento dessa relação permite a reprodutibilidade do título do soro ou do antígeno, por técnica direta de fixação de complemento.

O método é indicado para medir a avidéz do soro pelo antígeno, ao invés do poder de combinação entre o complexo formado e complemento. O complemento não mais é que um indicador indispensável ao método e não um elemento de medida do poder de combinação entre anticorpo chagásico e antígeno específico.

Fac. Medicina de Ribeirão Preto da Univ. São Paulo.

(<sup>1</sup>) Professor de Microbiol. e Imunologia.

(<sup>2</sup>) Professor de Higiene e Med. Preventiva.

(<sup>3</sup>) Assistente de Parasitologia.

## INTRODUÇÃO

A combinação de antígenos e anticorpos, na formação de complexos imunes, é avaliada, em muitos sistemas, pela fixação do complemento.

A introdução de métodos quantitativos de fixação de complemento permitiu avaliar numericamente a reação entre o complexo imune e complemento. A intensidade da reação traduzida em termos de complemento necessário a um dado grau de hemólise, podia ser avaliada em "títulos" definidos segundo critérios diferentes, ora pelo inverso da diluição do soro ou do antígeno, ora pela quantidade de complemento utilizado na reação ou então por uma relação entre complemento e um desses elementos.

A relação linear observada entre complemento e soro foi utilizada por WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>15</sup> como expressão do *título* do soro que reagia com quantidades de antígeno em reatividade máxima. Nessas condições os títulos podiam apresentar valores desiguais. Assim as discrepâncias nos títulos de 80 soros, em reações feitas simultaneamente foram de 5% em metade delas e de 16% em 10% dos casos; para titulagens não simultâneas, discrepâncias de 8% foram encontradas em 50% dos 268 soros examinados e de 25% em 10% deles (THOMPSON<sup>12</sup>).

Para reações não simultâneas, maiores discrepâncias entre títulos do mesmo soro, podiam ser levadas à conta de diferenças na qualidade do complemento (WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>16</sup>), como observadas em reações com extrato aquoso de bacilo da tuberculose e soro hiperimune produzido em cavalos.

O presente trabalho estuda a interdependência dessas variações pelo método de isofixação e avalia a capacidade específica de combinação entre antígeno e anticorpo no sistema moléstia de Chagas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Soro reagente.*

O soro utilizado foi uma mistura de vários soros reagentes para moléstia de

Chagas, com títulos maiores que 3, pela técnica de FREITAS & ALMEIDA<sup>5</sup>. A identificação do soro reagente era dada pela data em que essa mistura era feita. O soro que não tinha sofrido inativação anterior, era distribuído em (volumes de 5 a 10 ml) ampôlas, mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Na ocasião de usar, era o soro degelado em temperatura ambiente, homogeneizado por agitação cuidadosa e então inativado em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

### *Antígeno.*

O antígeno é preparado de acôrdo com a técnica descrita por FREITAS & ALMEIDA<sup>5</sup>. O antígeno que é mantido congelado em presença de excesso de clorofórmio, era livre desse solvente por borbulhamento de ar e então centrifugado a 16.000 G por 30 minutos. O sobrenadante era o antígeno que foi diluído em solução de NaCl a 0,85% por ocasião de usar.

### *Dilute do soro.*

Os soros que não reagiam nas provas de fixação de complemento para moléstia de Chagas eram separados e misturados para fazer um diluente para o soro. Algumas vezes reações foram praticadas com soro reagente diluído em solução salina de NaCl a 0,85%. Complemento, hemolisina e hemácias de carneiro, foram preparados e padronizados de acôrdo com a técnica descrita por ALMEIDA<sup>2</sup>.

### *Método.*

Foi empregado o método de isofixação (ALMEIDA<sup>1</sup>) com duas, três, quatro e cinco unidades de complemento. O tempo de incubação foi de 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , a hemólise tendo se processado em 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Curvas iso-hemolíticas foram traçadas pelos pontos correspondentes às quantidades de antígeno e de soro que formavam complexos capazes de fixar complemento, deixando uma unidade livre. Quando a hemólise de 50% não era observada diretamente, interpolação era feita para a determinação aproximada dessas quantidades.

*Determinação dos títulos.*

O título do complexo imune foi dado ora em termos de sôro (título do sôro), ora em termos de antígeno (título do antígeno) como a relação:

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

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

onde

$T_A$  = título do antígeno

$T_S$  = título do sôro

$A$  = antígeno

$S$  = sôro

$K'_{S,A}$  = complemento necessário para a reação com sôro e antígeno, de modo a deixar livre uma unidade de complemento (segundo a nomenclatura, proposta por THOMPSON *et al.*<sup>13</sup>).

No cálculo dos títulos do antígeno e do sôro, os valores de complemento necessário

para 50% de hemólise ( $K'_{S,A}$ ), foram calculados de acôrdo com a hemólise observada e quantidade de complemento inicialmente presente. Para evitar a introdução de erros no cálculo de  $K'_{S,A}$  pelo uso de fatores de conversão, foi empregado o método utilizado anteriormente por ALMEIDA & FREITAS<sup>3</sup> e que consiste na determinação da quantidade de complemento necessária para 50% de hemólise, em gráfico tendo por ordenadas os logaritmos das quantidades de complemento inicialmente presentes e por abscissas os logitos das hemólises respectivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas iso-hemolíticas levantadas para o sistema doença de Chagas (fig. 1) puderam ser inequivocamente classificadas como pertencentes ao tipo I, descrito por ALMEIDA<sup>1</sup>, para os sistemas tuberculose, lepra, vírus Coxsackie, blastomicose e coqueluche.

As relações quantitativas entre sôro reagente, antígeno e complemento, já tinham sido bem estudadas por WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>16</sup> em 1938, empregando sôro hiperimune de cavalo preparado com bacilo da tuberculose; o antígeno consistia em um extrato aquoso de bacilo da tuberculose, prèviamente tratado pela acetona. A estabilidade do antígeno e a capa-

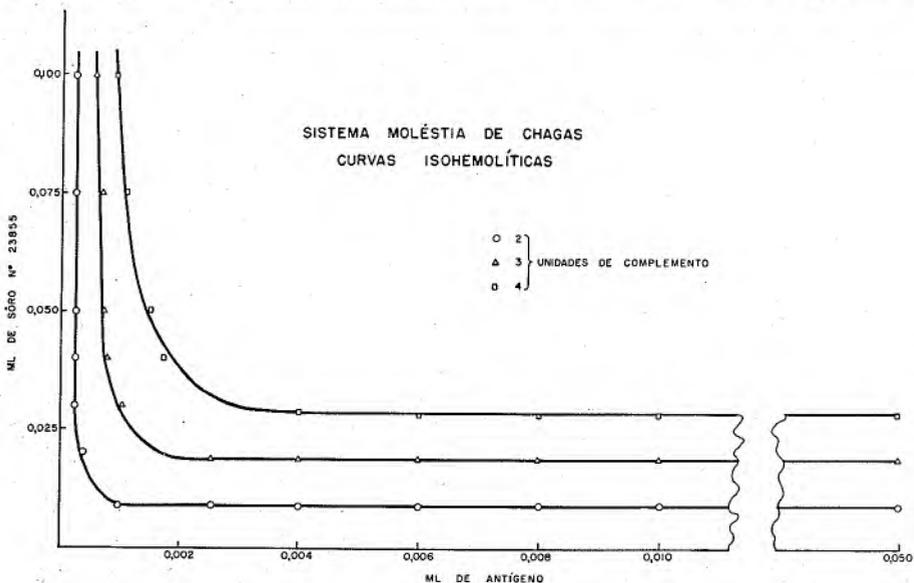


Fig. 1

cidade de fixar complemento pelo complexo imune formado com o sôro de cavalo permitiram a êsses autores a verificação do efeito da concentração relativa de sôro e de antígeno sôbre a atividade do complemento. As experiências foram realizadas em um intervalo de variação de concentração de sôro e de antígeno, quando um ou outro estava em grande excesso. Foi então possível o conhecimento do efeito do excesso de um dos elementos do complexo imune sôbre a capacidade fixadora para o complemento; estabeleceram-se assim as condições em que a fixação de complemento era função de sôro ou de antígeno e daí construíram um método de medida da concentração de anticorpo ou de antígeno em têrmos da quantidade de complemento necessário a um grau estipulado de hemólise. A introdução do conceito de proporcionalidade entre complemento fixado e agregado antígeno-anticorpo já tinha sido descrito por CALMETTE & MAS-SOL<sup>4</sup> em 1909; mas o estabelecimento das condições em que a reação devia ser feita para exprimir a fixação do complexo imune cabe indiscutivelmente a WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>14</sup>.

O título do complexo imune podia ser dado em têrmos da relação complemento:complexo. Ficava-se dessa forma livre de dar o título como dependente de uma quantidade arbitrária de sôro ou de antígeno tomado para referência. Haveria, nesse caso, gran-

de vantagem de se adotar o título por acréscimo proporcional como descrito originalmente por aquêles autores e discutido em detalhe por RICE<sup>10, 11</sup>.

A reação entre o complexo imune e complemento estava sujeita à "fixabilidade" do complemento. A propriedade de fixar-se ao agregado antígeno-anticorpo, dependeria largamente da espécie animal que fornecia o complemento (NOGUCHI & BRONFENBRENNER<sup>9</sup>; KOLMER, MATSUNAMI & TRIST<sup>7</sup>; HOET *et al.*<sup>6</sup>) e também mostrava-se variável dentro da mesma espécie (NOGUCHI & BRONFENBRENNER<sup>8</sup>; WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>17</sup>).

O uso de mistura de soros de várias cobaias (KOLMER *et al.*<sup>7</sup> WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>14</sup>) poderia diminuir as variações oriundas de grandes diferenças em "fixabilidade". Quando no entanto comparamos os títulos determinados em dias diferentes, no sistema moléstia de Chagas, empregando os mesmos elementos na formação do complexo imune, mas com misturas de soros de cobaias, de diferentes partidas, observamos variações nos títulos (quadro I). Essas variações encontradas nas reações entre o sôro chagásico 81155 e antígeno BT (de *T. cruzi*) e complementos n.ºs 36, 37 e 38, ocorreram concomitantemente e num mesmo sentido nos títulos do sôro e nos do antígeno.

#### QUADRO I

Capacidade de reação entre um determinado sôro chagásico e antígenos de três partidas, tendo variado o diluente e o complemento

Data	Sôro reagente	Diluente	Antígeno n.º	Complemen- to n.º	Títulos		Quociente $T_A / T_S$
					do sôro	do anti- geno	
11-11-55	81155	salina	B-7	34	184	3700	44,0
13- 1-56	81155	salina	BT	36	114	4700	41,2
16- 2-56	81155	salina	BT	37	100	4130	41,3
5- 4-56	81155	SFI771*	BT	38	118	4850	41,1
5- 6-56	81155	21556*	6	40	100	4250	42,5
Média							42,05

\* Mistura de soros não reagentes.

Na figura 2 os ângulos AOB e COD são iguais. Os lados dos ângulos são formados pelas linhas de regressão correspondentes aos títulos do antígeno e do sôro, determinados com dois complementos diferentes.

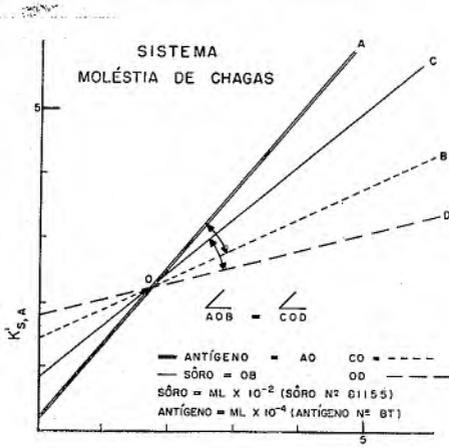


Fig. 2

A capacidade da reatividade específica entre antígeno e sôro pode ser determinada pela relação entre seus títulos e mostrou-se constante, num valor médio de 41,2. Pequenas diferenças nessa proporcionalidade foram encontradas nas reações com o mesmo sôro (81155) e antígenos de diferentes partidas (R-7 e 6).

O efeito do diluente no sôro reagente não alterou o quociente entre os títulos, no sistema moléstia de Chagas. Fato semelhante tinha sido assinalado no sistema tuberculose por WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>16</sup>.

O valor médio do quociente  $T_A/T_S$  (quadro I) foi de 42,05, para o sôro nº 81155; a determinação desse quociente para outros soros (quadro II) mostrou marcada diferença na "capacidade reativa específica", traduzida pela variação observada nesse quociente de proporcionalidade entre antígeno e anticorpo, mesmo quando se empregava o mesmo antígeno (R-7) e o mesmo complemento (nº 34). Ficava excluída a hipótese dessa variação ter ocorrido por diferenças na fixabilidade do complemento ou diverso poder de combinação do antígeno. Era então a tradução de uma propriedade do complexo formado e como todos os elementos, com exceção do sôro, eram os mesmos, sômente a êste sôro podia caber a responsabilidade da alteração do quociente de proporcionalidade.

Êsse quociente traduz a capacidade de reatividade específica entre antígeno e anticorpo e não depende da quantidade de complemento fixado, como demonstraram WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>16</sup> com soros hiperimunes de cavalo, no sistema tuberculose. A relação antígeno:sôro foi considerada então um índice do poder de combinação entre o antígeno e seu anticorpo homólogo.

Determinações foram feitas no sistema moléstia de Chagas (quadro II) empregando o mesmo antígeno, com soros diferentes. A variação encontrada nos valores do quociente antígeno:sôro traduz diversa capacidade de reação dos soros experimentados, pois em duas determinações o mesmo complemento (nº 34) foi empregado.

QUADRO II

Capacidade de reação entre um determinado antígeno e três soros chagásicos

Data	Sôro reagente	Diluyente	Antígeno nº	Complemen- to nº	Títulos		Quociente $T_A/T_S$
					do sôro	do anti- geno	
11-11-55	81155	salina	R-7	34	84	3700	44,0
19-10-55	23855	salina	R-7	33	110	2600	23,6
21-11-55	29955	salina	R-7	34	100	1900	19,0

A diversidade de comportamento dos soros chagásicos, em reações com um mesmo antígeno e complemento, não constitui uma exceção em sorologia. Além do achado relatado por WADSWORTH, MALTANER & MALTANER<sup>16</sup> no sistema tuberculose, encontramos freqüentes referências à diversidade do poder de combinação entre antígenos e anticorpos homólogos. Quando o anticorpo pode ser dosado por mais de um método, demonstração da diversidade de comportamento em fixação de complemento pode ser realizada, tomando por exemplo, a medida do precipitado, como referência. Assim WALLACE *et al.*<sup>18</sup> puderam demonstrar que o teor de anticorpos anti-albumina de boi, em coelhos, medido por técnica de fixação de complemento, não traduzia a totalidade dos anticorpos específicos medidos por reação de precipitação. A concordância entre os títulos de precipitinas e de anticorpos fixadores de complemento, demonstrada por RICE e SICKLES (1942), poderia estar limitada a soros obtidos após prolongada imunização. Segundo aqueles autores o título de fixação de complemento não representaria uma medida direta do conteúdo em anticorpo do soro, pois dependeria não somente da quantidade de anticorpo como de suas propriedades (WALLACE *et al.*<sup>18</sup>).

Dentro da mesma ordem de idéias não seria de se desprezar a hipótese de que em patologia humana, o poder de combinação do complexo imune com o complemento, traduzia mais um característico do anticorpo que sua concentração.

São bastante demonstrativos dessa diversidade de comportamento, os dados apresentados no quadro II. A capacidade de reatividade específica do anticorpo chagásico podendo diferir de soro para soro traz sério inconveniente na comparação de antígenos por técnica de fixação de complemento. Antígenos podem ser comparados em sua reatividade com o soro chagásico, dentro de um espaço de tempo, para avaliar sua estabilidade; outras vezes procura-se comparar antígenos de partidas diferentes, na verificação de sua qualidade. Em um e outro caso impõe-se o uso de um mesmo soro chagásico, que pode ser distribuído em pequenos volumes a serem usados quando necessário.

#### SUMMARY

*Specific reactive capacity of antigen with antibody in complement-fixation reaction for Chagas' disease.*

The reaction between sera from patients with Chagas' disease and antigen prepared from *T. cruzi* was studied by direct complement fixation technic employing the method of isohemolytic curves.

Several dilutions of complement were used in the tests with reacting human serum (diluted in saline or normal human serum) and serial dilutions of antigen. Linear relationship between serum and complement was found in reactions obtained with a large excess of antigen; the ratio between antigen and complement was found in an excess of serum. From these relations the reactivity of serum or antigen was given in terms of complement required for 50% hemolysis. The reproductibility of this value, as increment ratio titer, suffers the influence of the conditions in which the test is made, such as diluent, quality of complement and other factors not well known. Variations occurred in both sides of isohemolytic curves in the same directions, in such a way that the ratio between the titer of antigen and that of serum was constant for aliquot parts of the same serum, reacting with the same antigen, even in different conditions of the test. However, when different sera reacted with the same antigen, the values of this ratio were not the same, although the conditions of the tests were kept constant.

Determination of such a ratio appears to provide a constant index of the specific reactive capacity of antigen and immune serum.

The quantitative studies provide a method for accurate determination of the avidity of antigen and the immune serum in relation to each other and to the complement.

#### REFERÊNCIAS

- 1 — ALMEIDA, J. O. — Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement-fixation tests. *J. Immunol.* 76: 256-233, 1953.
- 2 — ALMEIDA, J. O. — Técnica da reação de Wassermann quantitativa. Emprêgo do colorímetro fotoelétrico na padronização dos reagentes e na leitura da reação. *Hospital, Rio de Janeiro* 35:847-898, 1950.

- 3 — ALMEIDA, J. O. & FREITAS, J. L. P. — Reações atípicas em fixação de complemento nos sistemas sífilis e doença de Chagas, pelo método quantitativo. Interpretação e determinação de títulos. Rev. brasil. Biol. 13:1-12, 1953.
- 4 — CALMETTE, A. & MASSOL, L. — Sur les conditions d'obtention de la réaction de déviation de l'alexine (Bordet-Gengou) avec les antigènes et les anticorps tuberculeux. Compt. rend. Soc. Biol. 67:528-530, 1909.
- 5 — FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação de complemento para moléstia de Chagas (reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*). Hospital, Rio de Janeiro 35:787-800, 1949.
- 6 — HOET, J. J.; BLOMFIELD, A. M. & COOMBS, R. R. A. — The selective absorption of haemolytic complements by antibodies from different species of animals. Brit. J. exper. Path. 35:32-34, 1954.
- 7 — KOLMER, J. A.; MATSUNAMI, T. & TRIST, M. E. — Studies in the standardization of the Wassermann reaction. IV. A general study of the complements of various animals with special reference to human and guinea pig complements and methods of collection. Am. J. Syph. 3:407-448, 1919.
- 8 — NOGUCHI, H. & BRONFENBRENNER, J. — The comparative merits of various complements and amboceptors in the serum diagnosis of syphilis. J. exper. Med. 13:78-91, 1911.
- 9 — NOGUCHI, H. & BRONFENBRENNER, J. — Variations in the complement activity and fixability of guinea-pig serum. J. exper. Med. 13:69-77, 1911.
- 10 — RICE, E. C. — 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. Immunol. 59:95-106, 1948.
- 11 — RICE, E. C. — A study of the reliability of complement fixation as a method of measuring the activities of sera of high, medium, and low antibody titer. J. Immunol. 55:1-13, 1947.
- 12 — THOMPSON, W. R. — Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose. Bact. Rev. 11:115-145, 1947.
- 13 — THOMPSON, W. R.; RICE, E. C.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — Some fundamental notions in estimation of complement fixation. I. General relations and a proposed uniform notation. J. Immunol. 62:353-361, 1949.
- 14 — WADSWORTH, A.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. J. Immunol. 21:313-340, 1931.
- 15 — WADSWORTH, A.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantitative studies of the complement-fixation reaction with syphilitic serum and tissue extract; technic of the practical quantitative test. J. Immunol. 35:217-234, 1938.
- 16 — WADSWORTH, A.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantitative studies of the reaction of complement-fixation with tuberculous immune serum and antigen. J. Immunol. 35:93-103, 1938.
- 17 — WADSWORTH, A.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — A study of the complement-fixation reaction in tuberculosis. J. Immunol. 10:241-431, 1925.
- 18 — WALLACE, A. L.; OSLER, A. G. & MAYER, M. M. — Quantitative studies of complement-fixation. V. Estimation of complement-fixing potency of immune sera and its relation to antibody-nitrogen content. J. Immunol. 65:661-673, 1950.

Recebido para publicação em 7 outubro 1959.