

PRESENÇA DE INIBIDOR ESPECÍFICO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO, EM ANTÍGENOS PREPARADOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*¹

Dres. José Oliveira de Almeida,² Aluízio Prata,³ Augusto Corredor Arjona⁴ e João Batista Arantes⁵

Um hapteno inibidor específico para a fixação de complemento com sôros chagásicos, foi isolado de Trypanosoma cruzi. A contaminação dos antígenos de T. cruzi, com esse inibidor, falseia os títulos dos sôros chagásicos, quando determinados por método quantitativo de fixação de complemento.

Sôros de pacientes com moléstia de Chagas, em fase crônica, comprovada parasitológicamente, podiam apresentar reatividades diferentes, em reações quantitativas de fixação de complemento, segundo o antígeno empregado.

Com a introdução do antígeno metílico (11, 12), pode-se comparar os títulos dos sôros chagásicos, determinados com o antígeno metanólico e com o antígeno aquoso-cloroformado (14). As discrepâncias nos títulos achados com antígenos preparados de um mesmo lote de tripanosomas, sempre favoreciam o antígeno metanólico, de maior reatividade.

Como os antígenos eram extraídos por diferentes solventes, poder-se-ia admitir que as suas reatividades dependeriam qualitativamente dos haptenos melhor extraídos, por sua maior solubilidade em metanol que em água-cloroformada. Tais haptenos, em uma e outra preparação, reagiriam com tipos de anticorpos diferentes a dai a diversidade dos resultados. Podia-se justificar a diferença em reatividade antigênica, admitindo-se a presença de haptenos capazes de formar,

com os anticorpos chagásicos, complexos não fixadores de complemento. Esses inibidores competiriam com o hapteno específico fixador, reduzindo o título do sôro chagásico.

Neste trabalho, evidência é apresentada de inibidores específicos de fixação de complemento, encontrados nos antígenos aquosos de *Trypanosoma cruzi*. O hapteno inibidor, extraído pela água, de tripanosomas previamente tratados pelo metanol, reagia fracamente em fixação de complemento, com sôros chagásicos e reduzia a atividade do antígeno metílico, quando a ele era adicionado.

Um método de preparo de antígeno de *T. cruzi*, livre de inibidores, é apresentado.

Material e métodos

Antígenos de Trypanosoma cruzi

Os antígenos, empregados neste ensaio, foram preparados de um mesmo lote de tripanosomas, cepa BT, cultivados em meio difásico (14). Os tripanosomas, desidratados, eram exaustivamente tratados com benzeno e depois, secos em pentóxido de fósforo, em vácuo.

O antígeno metílico I foi preparado com 100 mg de pó de tripanosomas suspensos em 20 ml de metanol anidro. A mistura foi submetida ao ultra-som, na freqüência de 20 quilociclos por segundo, em desintegrador

¹ Trabalho custeado pela Organização Pan-Americana da Saúde.

² Professor catedrático, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

³ Professor catedrático, Clínica de Doenças Tropicais e Infeciosas, Faculdade de Medicina, Bahia, Brasil.

⁴ Professor catedrático, Parasitologia, Faculdade de Medicina, Bogotá, Colômbia.

⁵ Instrutor, Departamento de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Araraquara, São Paulo, Brasil.

MSE de 500 watts, durante 40 minutos, sem refrigeração. O volume foi reconstituído, por adição de metanol e a suspensão centrifugada em Servall SS, por 15 minutos, a 10.000 rotações por minuto. O sobrenadante é o *antígeno metílico I*. Uma segunda extração era feita do sedimento, com 5 ml de metanol, como anteriormente e o sobrenadante era juntado ao primeiro.

O *hapteno inibidor* foi preparado a partir do sedimento de tripanosomas tratados pelo metanol. O sedimento era seco e suspenso em 10 ml de água destilada, sendo a extração feita em ultra-som, como anteriormente descrito. Centrifugada a mistura, o sobrenadante continha o *hapteno inibidor*.

O *antígeno aquoso* é o sobrenadante do antígeno aquoso-cloroformado, preparado por extração com água e clorofórmio, segundo método anteriormente descrito (14).

O sedimento do antígeno aquoso-cloroformado, depois de seco, é extraído pelo metanol, sendo o sobrenadante o *antígeno metílico II*.

Os antígenos aquosos são conservados em geladeira, com azida sódica a 1:5000. Os antígenos metílicos são mantidos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Sôros chagásicos

Os sôros eram de pacientes com moléstia de Chagas em fase crônica, diagnosticada clínica e parasitológicamente, tendo tido xenodiagnóstico positivo ou parasitemia em sangue periférico.

Os sôros foram congelados e mantidos a -30°C até a ocasião em que foram distribuídos em volumes de 1 ml e liofilizados, em aparelho Edwards P-30, adaptado para usar gelo seco e álcool no condensador. A secagem secundária era feita em pentóxido de fósforo e vácuo. Os frascos eram fechados a vácuo, com tampas parafinadas. Os sôros liofilizados foram mantidos em geladeira.

Quando necessário, os sôros eram reconstituídos pela adição de 1 ml de água des-

tilada. A inativação era processada a 55°C ± 0,5°C em banho-maria.

Complemento

O complemento empregado neste ensaio provinha de um mesmo lote (n° 210), liofilizado em volumes de 2.5 ml. Era reconstituído com 2 ml de água destilada e preservado pelo método de Richardson (18). O complemento era dosado com hemácias de carneiro, sensibilizadas com dose ótima de hemolisina, segundo método descrito (2).

Diluições eram preparadas para conter múltiplos da unidade 50 por cento de complemento em volumes de 0.1 ml.

Diluente

O diluente empregado foi a solução de cloreto de sódio a 0.85%, tamponada com borato (21). Na diluição do sôro foi também empregado o sôro normal humano diluído a 1/5.

As diluições eram feitas de acordo com o seguinte método: preparada a solução inicial do sôro ou do antígeno, em volume de 10 ml, em um frasco de base quadrada, era retirado para um primeiro tubo, um volume, de acordo com a razão de série geométrica de diluições, a serem preparadas. Assim para razão 0.8, retirava-se um volume de 2 ml, com pipeta volumétrica, para um primeiro tubo da série, sendo juntado ao frasco, igual volume do diluente. Misturava-se, girando o frasco, em posição inclinada, e repetia-se a operação, até se ter o número desejado de diluições. Quando a razão era de 0.75, o volume inicial da solução era de 8.0 ml, retirando-se 2 ml para um primeiro tubo e substituindo-os pelo diluente. Preparada a série de diluições, pode-se calcular facilmente a quantidade de sôro (ou de antígeno) presente em qualquer um dos tubos.

Reação de fixação do complemento

As reações quantitativas de fixação de complemento foram realizadas por métodos

descritos anteriormente (2, 9, 10), compreendendo três modalidades:

1. Determinação da relação linear entre o complemento e o complexo imune. Nessas condições, quando a variável dependente era o sôro, determinava-se a inclinação da linha de regressão $K'_{S,A}$ versus sôro, como o título do sôro (16, 17). Quando a variável dependente era o antígeno, a relação linear entre antígeno e complemento necessário para 50 % de hemólise ($K'_{S,A}$) exprimia o título do antígeno (4).

2. Levantamento das curvas iso-hemolíticas com duas ou mais quantidades de complemento, pelos pontos correspondentes às quantidades de antígeno e de sôro que formavam complexos capazes de fixar a mesma quantidade de complemento, deixando dêle o suficiente para hemólise de 50% (4). Quando esse grau de hemólise não era observado diretamente, interpolação era feita para determinar aproximadamente esses valores.

3. Determinação do complemento fixado, em tempos diversos, durante a incubação preliminar, pela mistura de sôro, antígeno e complemento. Determina-se o número de unidades de complemento livre, pelo tempo necessário a hemólise de 50%, em uma alíquota (2 ml) da mistura a que se juntaram 0.2 ml de hemácias sensibilizadas. A medida da hemólise é feita com as células em suspensão, em espectrofotômetro Zeiss PMQ II, dotado de câmara de temperatura controlada (37°C), e em cubetas de faces paralelas e em comprimento de onda de 580 mu (1, 9). Conhecendo-se, por um ensaio prévio a relação entre tempo de hemólise (K_t) e a concentração de complemento, podem-se calcular as unidades de complemento livres na amostra, e então, a quantidade de complemento fixado.

Nomenclatura

Foi empregada a nomenclatura adotada para as reações quantitativas de fixação de complemento (19), com mais alguns sím-

bolos anteriormente propostos para os estudos da cinética de hemólise (1, 9).

Resultados e comentários

As provas de competição entre antígenos de *T. cruzi* e o sôro chagásico 671226 foram realizadas com o antígeno aquoso e com o antígeno metílico I, ambos em dose de máxima reatividade, determinada por método de isofixação (4) com 3 e 6 unidades de complemento. Foi também experimentada a mistura dos dois antígenos, cada um dêles em dose ótima. Os resultados estão apresentados no quadro 1 e figura 1.

O título do sôro com o antígeno metílico I foi o mais alto (291) e com o antígeno aquoso o mais baixo (126); um título intermediário foi achado quando se empregou a mistura dos dois antígenos (197).

Para elucidar a interdependência dessas reações, as mesmas diluições de sôro foram postas a reagir com um dos antígenos, por 5 minutos, com agitação, para perfeita mistura. Em seguida, juntou-se o segundo antígeno e alguns minutos depois, o complemento.

O título do sôro que reagia primeiro com o antígeno aquoso e em seguida com o metílico I, foi de 219, mostrando que a junção do antígeno metílico à mistura, aumentou o título. Isso poderia significar que no sôro chagásico, alguns anticorpos eram mais ávidos para o antígeno metílico, ou que os complexos formados com o antígeno aquoso eram parcialmente dissociáveis, os anticorpos livres recombinando-se com o antígeno metílico.

Quando juntava-se ao sôro o antígeno metílico I, e em seguida o antígeno aquoso, o título foi de 278, valor esse maior que os encontrados com o antígeno misto, ou com o antígeno aquoso a que se adicionou o antígeno metílico. Calculando-se as discrepâncias relativas entre os títulos, pôde-se avaliar a reatividade de cada antígeno, juntados de uma ou de duas vezes, ao sôro.

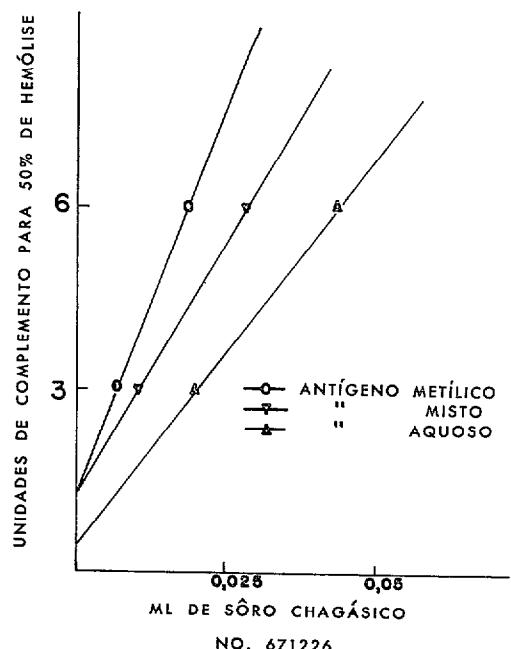
Examinado o quadro 2, verifica-se que o título do sôro, determinado com o antígeno

QUADRO 1—Reações de Fixação de Complemento Direta e Indireta, entre Sôro Chagásico e os Antígenos Aquoso e Metílico I.

ml de sôro 671226	Antígenos												Contrôle do sôro	
	Aquoso		Metílico I		Misto		(Aq) + (Met)		(Met) + (Aq)					
			Hemólise % com unidade de complemento											
r = 0,75	3U	6U	3U	6U	3U	6U	3U	6U	3U	6U	3U	6U	2U	
0.0500	0	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
0.0375	0	70	0	0	0	15	0	10	0	0	0	0	100	
0.0280	20	85	0	0	0	40	0	35	0	0	0	0	100	
0.0210	45	100	0	35	0	75	10	70	0	20	0	0	100	
0.0160	70	0	55	15	95	25	90	0	55	0	0	0	100	
0.0120	85	0	80	35	0	40	0	10	0	85	0	0	100	
0.0090	100	25	95	65	0	65	0	25	0	90	0	0	100	
0.0065	50	0	85	0	80	0	80	0	45	0	0	0	100	
0.0050	75	0	85	0	85	0	85	0	70	0	0	0	100	
0.0040	85	0	85	0	95	0	95	0	85	0	0	0	100	
Título do sôro = $\Delta K'_{S,A}/\Delta S$														
Complemento		126	291		197		219		278		Contrôle do complemento			
1U	10	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	50		
2U	90	90	85	75	80	80	75	80	80	80	80	100		

FIGURA 1—Reações de Fixação de Complemento com os Antígenos Metílico, Aquoso e Misto, de *T. cruzi* e Sôro Chagásico.

REAÇÃO DE GUERREIRO-MACHADO



metílico I (291) não difere significantemente do título obtido com a mistura de antígeno *metílico* e antígeno *aquoso* (278), quando êsses antígenos reagiam com intervalo de 5 minutos, um do outro. Tudo se passava como se o antígeno *metílico* formasse complexos imunes com todos os anticorpos cha-

QUADRO 2—Discrepâncias Relativas entre os Títulos do Sôro 671226 em Reações de Fixação de Complemento Quantitativa com Antígenos de *Trypanosoma cruzi*, Isolados ou em Combinação.

Em combinação	Títulos do sôro com os antígenos			
	Isolados	Metílico I 291	Aquoso 126	Misto 197
(Aq) + (Met)	219	28.2%	54.1%	7.1%
(Met) + (Aq)	278	4.6%	75.2%	34.0%

(Aq) + (Met): Foi juntado o antígeno aquoso às diluições de sôro e depois de 5 minutos juntou-se o antígeno *metílico*.

(Met) + (Aq): Foi juntado o antígeno *metílico* às diluições de sôro e depois de cinco minutos juntou-se o antígeno *aquoso*.

Misto: É a mistura dos antígenos *metílicos* e *aquoso*, em doses de máxima reatividade.

^a A discrepância relativa é o quociente entre a diferença dos títulos e a sua média aritmética.

$$Dr = \frac{2(T_1 - T_2)}{(T_1 + T_2)}$$

gásicos, estáveis e não dissociáveis pelo antígeno *aquoso*, que não encontraria, ao ser adicionado, anticorpos livres para reagir. A discrepância relativa entre êsses títulos foi de 4.6% perfeitamente dentro do esperado, na hipótese dos抗ígenos terem reagido igualmente.

Do mesmo modo, não houve discrepância significativa, entre os títulos determinados com o antígeno *misto* e com o antígeno *aquoso*, quando a êste se juntava, cinco minutos depois, o antígeno *metílico*.

Nesse caso, o antígeno *aquoso* formaria complexos com parte dos anticorpos chagásicos e que seriam dissociáveis pelo antígeno *metílico*. O equilíbrio poderia se dar, tanto em reações onde os dois抗ígenos estivessem presentes, como quando o *aquoso* era empregado em primeiro lugar. Outra hipótese, no entanto, poderia ser apresentada, admitindo-se a presença, no antígeno *aquoso*, de um *hapteno específico* para anticorpos chagásicos, formando complexos não fixadores de complemento. Tais complexos podiam também sofrer uma dissociação, entrando em equilíbrio com os抗ígenos presentes, simultaneamente ou em reações em que o antígeno *aquoso* reagia em primeiro lugar.

As maiores discrepâncias (78.9% e 75.2%) foram observadas entre as reações com o antígeno *aquoso* e com o antígeno *metílico*, quando usado isoladamente ou antecedendo o antígeno *aquoso*. A reação de fixação de complemento alcança valores máximos com o antígeno *metílico*, não sendo possível ultrapassá-los mediante a adição do antígeno *aquoso*.

Quando se compararam os títulos com o antígeno *aquoso*, com aqueles obtidos com o antígeno *misto* ou com o antígeno *metílico*, a que se juntou o *aquoso*, as discrepâncias são também altas, mostrando que a reação de fixação de complemento foi aumentada pelo antígeno *metílico*, tanto em mistura com o antígeno *aquoso*, como quando adicionado a este antígeno.

No entanto, quando o título do sôro com o antígeno *metílico* é comparado com os determinados com抗ígenos compostos de antígeno *aquoso* e de antígeno *metílico*, misturados de uma ou em duas vêzes, verifica-se uma diminuição na capacidade fixadora do complemento. As discrepâncias observadas (37.8 e 28.2%) indicam o efeito inibidor do antígeno *aquoso*, em competição com o antígeno *metílico*.

As provas anteriores sugeriam que o antígeno *metílico* não possuía ou tinha em pequena quantidade "um hapteno inibidor" encontrado em maior quantidade no antígeno *aquoso*. O hapteno devia ser pouco solúvel em metanol, e solúvel em água. Dessa forma, os tripanosomas extraídos pelo álcool *metílico* deveriam conter êsse "hapteno inibidor," que dêles poderia ser extraído pela água.

Tendo sido preparado o *hapteno inibidor*, foi ele experimentado em um ensaio comparativo com o antígeno *metílico I* e com êsse antígeno contaminado pelo hapteno. Os resultados estão apresentados no quadro 3 e na figura 2.

O antígeno *inibidor* reagia fracamente em fixação de complemento com o sôro chagásico e inibia a sua reação, parcialmente, com o antígeno *metílico*.

A reação de fixação do complemento pôde ser estudada, durante a incubação preliminar a 37°C, quando feita com êsses抗ígenos. Os resultados com os抗ígenos *metílico II*, com o hapteno *inibidor* e com a mistura de ambos, estão apresentados no quadro 4 e figura 3.

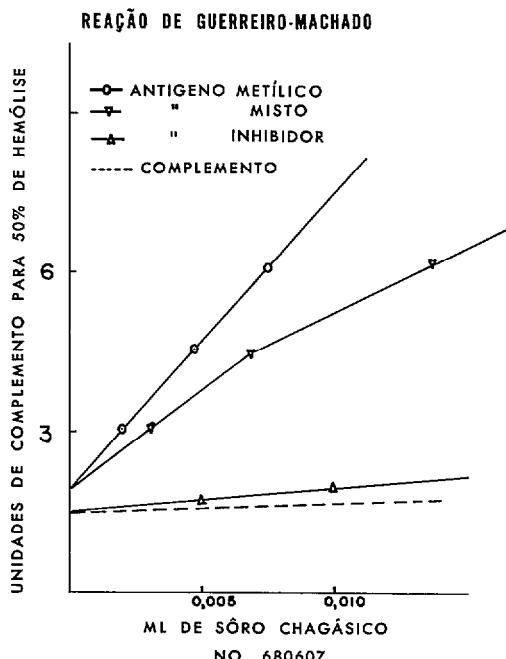
Verifica-se que o inibidor não fixa complemento em grau apreciável e que sua presença tem efeito retardador na fixação do complemento entre o sôro chagásico e o antígeno *metílico II*.

A especificidade do hapteno *inibidor* para os anticorpos chagásicos pôde ser verificada, contaminando com ele, os抗ígenos específicos para sífilis (15), brucelose (10), lepra (6), esquistossomose (13) e moléstia de

QUADRO 3—Reações com o Antígeno Metílico I, Antígeno Inibidor e com o Antígeno Misto.^a

^a Ver figura 2.

FIGURA 2—Reações de Fixação de Complemento com os Antígenos Metílico, Inibidor e o Metílico Contaminado com Inibidor.



Chagas, procedendo-se as determinações dos títulos dos sôros de pacientes infectados, e comparando-os com aqueles determinados com o antígeno não contaminado. Os resultados estão apresentados no quadro 5.

Discrepâncias até 16% podem ser admitidas em reações de fixação de complemento, feitas simultaneamente, sendo devidas a imprecisão do método. Discrepâncias maiores que 16% sómente foram observadas

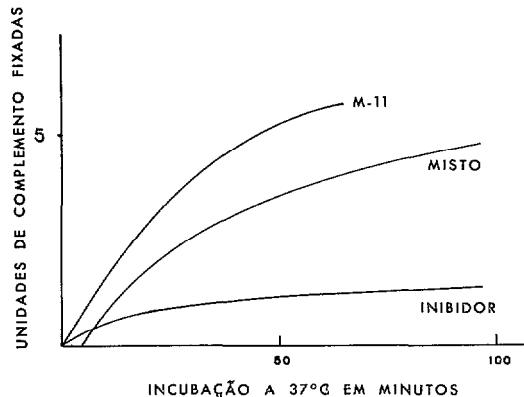
QUADRO 4—Fixação de Complemento em Reações com o Sôro Chagásico 671206 e os Antígenos Metílico II (M-II), Misto e Inibidor.

Tempo de incubação a 37°C	Unidades de complemento fixadas ^a com antígeno		
	M-II	Misto	Inibidor
10 minutos	1.5	0.8	0.5
20 "	3.0	2.0	0.8
40 "	4.6	3.0	1.0
60 "	5.6	3.9	1.2
90 "	...	4.7	1.4

^a A quantidade de complemento livre era calculada pelo tempo necessário para 50% de hemólise. Aliquotas de 2 ml eram retiradas, juntadas 0,2 ml de hemácias sensibilizadas e medido o tempo para 50% de hemólise, com as células em suspensão, em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 580 e em câmara mantida a 37°C.

FIGURA 3—Fixação de Complemento durante a Incubação Preliminar a 37°C em Reações com os Antígenos Metílico II, Inibidor e com o Antígeno Metílico Contaminado com Este Último.

REAÇÃO DE GUERREIRO E MACHADO



QUADRO 5—Títulos de Sêros Determinados com os Antígenos Específicos, com ou Sem o Inibidor Isolado de *Trypanosoma cruzi*.

Sistema	Sêro	Antígeno	Título	Discrepância relativa
Brucelose	J.B.	B. abortus (10)	162	
		" + inibidor	156	3.7%
	J.J.	B. abortus	256	
		" + inibidor	228	11.6%
Sífilis	J.S.	B. abortus	920	
		" + inibidor	920	0%
	96	Cardiolipina (15)	520	
		" " + inibidor	540	3.8%
Esquistossomose	124	Cardiolipina	1,534	
		" " + inibidor	1,534	0%
	211	Cardiolipina	4,120	
		" " + inibidor	4,500	8.8%
Lepra	1997	S. mansoni (13)	138	
		" + inibidor	130	5.9%
	1935	S. mansoni	98	
		" + inibidor	108	9.2%
Moléstia de Chagas	4227	M. tuberculosis (6)	100	
		" + inibidor	114	13.1%
	4340	M. tuberculosis	1,060	
		" + inibidor	980	7.8%
	4372	M. tuberculosis	2,640	
		" + inibidor	2,760	4.4%
	680826	T. cruzi (M-II)	775	
		" + inibidor	292	90.6%
	680725	T. cruzi (M-II)	616	
		" + inibidor	282	74.5%
	680607	T. cruzi (M-I)	318	
		" + inibidor	247	25.6%
	671228	T. cruzi (M-I)	264	
		" + inibidor	184	35.7%
	671214	T. cruzi (M-I)	168	
		" + inibidor	86	54.6%

Discrepâncias maiores que 16% foram sómente observadas no sistema moléstia de Chagas, mostrando ser específica a ação do inibidor extraído do *Trypanosoma cruzi*.

no sistema doença de Chagas, mostrando o efeito de inibição específica do hapteno, pois em trabalho anterior ficou demonstrado que nesse sistema, a freqüência das observações defeituosas (discrepâncias maiores que 16%) não era maior que aquela observada em outros sistemas (8, 20).

A presença de inibidores específicos de fixação de complemento tinha sido assinalada em抗ígenos aquosos de bacilo da tuberculose (3, 5). Esse cripto-antígeno reagia melhor com os anticorpos tuberculosos, que com os de grupo encontrados em sôros de lepra lepromatosa. Não reagia, no entanto, com sôros de calazar, não inibindo a reação com o antígeno aquoso de bacilo da tuberculose. Nesse caso, os títulos alcançavam

valores mais altos que os determinados em tuberculose ou lepra (3, 5).

O efeito inibidor do hapteno, não se faz sentir com a mesma proporcionalidade em todos os sôros chagásicos. Assim, enquanto o sôro 680826 apresentou títulos com discrepância de 90.6%, o de nº 680607 teve uma discrepancia de apenas 25.6%. Isso sugere que a proporção dos anticorpos que se combinam com o inibidor, não é a mesma nesses sôros, ou que a constante de dissociação dos complexos formados difere de sôro para sôro.

Em trabalho anterior (7) aventávamos a possibilidade do "poder de combinação do complexo imune com o complemento, traduzir mais uma característica do anticorpo, do que a sua concentração."

Essas características podiam ser mostradas em seu poder reagir com抗ígenos semelhantes, específicos, mas não iguais em todas as suas propriedades. Assim, o sôro 680808 foi titulado com os *antígenos metílicos I e II* e com o antígeno *aquoso*, empregados em dose de reatividade paralela (7, 8). E os抗ígenos foram, por sua vez, titulados em excesso de sôro, pois o sistema de Chagas pertence ao tipo I de isofixação (4).

Os resultados dessas dosagens estão apresentados no quadro 6.

Determinando se a capacidade reativa específica (7) como o quociente do título do antígeno pelo título do sôro, verifica-se que o antígeno *aquoso* é o de menor capacidade (0.06), sendo o *metílico II* o de maior reatividade (37.2). Os抗ígenos metílicos tinham maior capacidade reativa específica e como esta, depende também do sôro, um ensaio foi feito com mais três outros sôros.

Os resultados são mostrados no quadro 7.

Analizando os dados do quadro 7, observa-se que os sôros 680809 e 680813 apresentam títulos quase iguais (800 e 820) com o antígeno *metílico I* (M-I), enquanto os títulos dêsses抗ígeno, em presença de excesso dêsses sôros, foram respectivamente de 6400 e 10944. Esses dados sugerem que sendo a dosagem feita em diluições elevadas de antígeno, a reação抗ígeno-anticorpo se passaria com o hapteno de maior concentração inicial. Outros haptenos contaminantes inclusive o inibidor, não agiriam, por estarem extremamente diluídos. Assim os títulos encontrados para um mesmo抗ígeno, com dois sôros, traduziriam mais a composição dos sôros em relação aos anticorpos específicos para o constituinte抗ígenico, de maior concentração inicial. No caso em exemplo, o sôro 680813 teria mais anticor-

QUADRO 6—Determinação dos Títulos do Sôro 680808 e dos Antígenos Aquoso, Metílico I e Metílico II e de Suas Capacidades de Reatividade Específica.^a

Sôro ml ^b	Antígeno diluído	Complemento unidades	Hemólise %	K's _{s,a}	Título do sôro	Título do antígeno	C.R.E. Ta/Ts
0.0043	M-I	1/80	3	20	3.96	265	
0.0164	M-I	1/80	6	25	7.14		
0.0500	M-I	1/1280	3	50	3.0		
0.0500	M-I	1/160	6	45	6.24	5925	22.4
0.0043	M-II	1/80	3	30	3.57	534	
0.0084	M-II	1/40	6	55	5.76		
0.0500	M-II	1/1280	3	55	2.88	19882	37.2
0.0500	M-II	1/320	6	40	7.54		
0.0105	Aq.	1/4	3	55	2.88	207	
0.0256	Aq.	1/2	6	50	6.00		
0.0500	Aq.	1/32	3	50	3.00		
0.0500	Aq.	1/4	6	55	5.76	12.6	0.06

^a Os dados foram coligidos das curvas isoêmolíticas dos抗ígenos metílico I (M-I), metílico II (M-II) e do aquoso (Aq.), em reações com 3 e 6 unidades de complemento e uma mistura de sôros chagásicos (mistura 680808), feitas simultaneamente, com os mesmos elementos do sistema hemolítico.

^b O sôro foi diluído em série geométrica de razão 0.8.

QUADRO 7—Determinação da Capacidade Reativa Específica dos Antígenos Metílicos I e II em Reações com Quatro Diferentes Misturas de Sôros Chagásicos.

Mistura de sôros chagásicos	Título do sôro com o antígeno		Título do antígeno		Capacidade reativa específica	
	M-I	M-II	M-I	M-II	M-I	M-II
680808	265	534	5925	19882	22.4	37.2
680809	800	790	6400	8900	8.0	11.3
680812	700	826	11072	6720	15.8	8.1
680813	820	572	10944	15072	13.3	26.3

As reações foram feitas com 3 e 6 unidades de complemento e os títulos foram determinados como a inclinação entre o acréscimo de complemento pelo acréscimo do complexo imune, em termos de sôro (título do sôro) ou em termos de antígeno (título do antígeno). A capacidade reativa específica é o quociente entre o título do antígeno e o título do sôro.

pos específicos que o sôro 680809, para reagir com o hapteno que se encontrava em maior quantidade no antígeno metílico. Na titulação dos sôros, usando-se o antígeno em excesso, a reação se processaria entre os anticorpos e todos os haptenos do antígeno, incluindo o inibidor. A resultante de todas essas reações, com complexos, fixadores e não fixadores de complemento se traduz pelo título do sôro, que poderá ter o mesmo valor para sôros de composição diversa em anticorpos.

Quando se determinam as respectivas capacidades reativas específicas para êsses sôros, verifica-se que realmente o antígeno metílico I reage mais intensamente com o sôro 680813 que com o sôro 680809. Da mesma forma, com o antígeno metílico II (M-II), as capacidades reativas específicas, foram maiores respectivamente de 26.3 e 11.3.

Quando os dois antígenos metílicos (M-I e M-II) são comparados pelos títulos com eles determinados nos mesmos sôros, em reações simultâneas, verifica-se que de quatro observações (15), três são defeituosas (15), por apresentarem discrepâncias maiores que 16%. De acordo com os critérios adotados na comparação de antígenos (8, 15, 20), por métodos de fixação de complemento quantitativa, um dos antígenos é rejeitado, se o outro for tomado como padrão. Os dois antígenos metílicos M-I e M-II não têm reatividade específica comparável, dentro das

exigências feitas para a aprovação dos抗ígenos de cardiolipina (15).

Dêsse ensaio se poderá concluir da impossibilidade de se poder comparar antígenos de *T. cruzi*, em reações com um sôro de referência, ou com uma mistura de sôros chagásicos. No exemplo, os dois antígenos metílicos seriam considerados iguais, se a comparação fosse feita apenas com o sôro 680809. O uso de outros sôros, na comparação da reatividade específica, mostrou que êsses dois抗ígenos não eram iguais.

O número de sôros a serem titulados em um ensaio comparativo de antígenos dependerá da freqüência de observações defeituosas encontradas, de acordo com o método de análise seqüencial de probabilidade direta (6, 15, 20) aplicado nos sistemas sífilis (15) e lepra (6). O uso dos mesmos critérios adotados para êsses sistemas se justifica porque as discrepâncias relativas, em reações em duplicata e simultâneas, não foram mais freqüentes no sistema moléstia de Chagas (8), que naqueles anteriormente estudados (6, 15, 20).

Como na comparação de reatividade específica dos antígenos, os sôros são titulados em excesso de antígeno (6), a contaminação dêle com haptenos inibidores poderá ser a principal causa das observações defeituosas (6, 15, 20).

Um antígeno desprovido de inibidores poderá ser preparado tratando os tripanosomas previamente extraídos com água cloro-

formada, pelo metanol, como descrito em "material e métodos." O antígeno *metílico II* poderia ser o antígeno de referência, nas provas de comparação da reatividade específica de抗ígenos preparados de *Trypanosoma cruzi*.

Resumo

A titulação pelo método quantitativo de fixação de complemento, de sôros de pacientes com doença de Chagas comprovada parasitológicamente, empregando-se extratos aquosos e metílicos de *Trypanosoma cruzi* como抗ígenos, mostrou grande discrepância nos títulos. O título do sôro era expresso pela inclinação da linha de regressão entre as quantidades de sôro e o número de unidades de complemento necessárias para 50 por cento de hemólise.

Foi com o antígeno metílico que se obtiveram, em todos os casos, os títulos mais altos. Observou-se também que a adição do antígeno aquoso ao metílico faz baixar consideravelmente o título. Parece ter-se comprovado a presença de um hapteno capaz de combinar-se especificamente com os anticorpos chagásicos para formar complexos imunes que não fixam o complemento.

Solúvel em água e quase insolúvel em metanol, o inibidor pode ser isolado como ex-

trato aquoso de tripanosomas tratados com metanol. Esse hapteno reagia fracamente em fixação de complemento com sôros chagásicos. Na sua adição ao antígeno metílico observou-se forte inibição, porém somente com sôros chagásicos, nunca com sôros de casos de sífilis, brucelose, lepra ou esquistossomíase.

Pode-se preparar um antígeno isento de hapteno inibidor, tratando-se com água saturada com clorofórmio os tripanosomas desidratados, previamente submetidos ao benzeno para eliminar as substâncias lipóides. Secam-se novamente os tripanosomas extraídos e adiciona-se metanol. A extração pode ser feita em autoclave, a 121° C por 10 minutos, ou mediante vibração ultrasônica de 20 KC/seg. O antígeno conserva-se à temperatura ambiente.

Como no sistema antígeno-anticorpo da doença de Chagas a freqüência das observações defeituosas em titulações serológicas duplas e simultâneas com os mesmos reativos não é maior que nos sistemas da sífilis ou da lepra, a comparação da reatividade específica dos抗ígenos preparados com *Trypanosoma cruzi* pode ser feita segundo os mesmos critérios, mediante o emprêgo do método de análise seqüencial aplicado à padronização dos抗ígenos de cardiolipina.

REFERÊNCIAS

- (1) 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.
- (2) Almeida, J. O. "Técnica da Reação de Wasserman Quantitativa. Emprêgo do Colorímetro Foto-Elétrico na Padronização dos Reagentes e na Leitura da Reação". *Hospital (Rio)* 35:847-898, 1950.
- (3) Almeida, J. O. "Complement-Fixation Reactions with Antigens Isolated from Tubercle Bacilli". *Ann Rep Div Lab Res New York State Dep Health* 12-13, 1956.
- (4) Almeida, J. O. "Isofixation Curves As A Method of Standardizing Quantitative Complement Fixation Tests". *J Immunol* 76:259-263, 1956.
- (5) Almeida, J. O. "Cripto-Antígenos e Cripto-Reações com Antígenos de Bacilo da Tu-
- berculose e Sôros de Leprosos, em Reações de Fixação de Complemento". *Cienc Cult* 19:71-76, 1958.
- (6) Almeida, J. O. "Preparo, Padronização e Comparação de Antígenos em Reações Quantitativas de Fixação de Complemento com Sôro de Doentes de Lepra". *Rev Brasil Lepr* 26:181-271, 1958.
- (7) Almeida, J. O., Freitas, J. L. P. e Siqueira, A. F. "Capacidade Reativa Específica do Antígeno com Anticorpo em Reações de Fixação de Complemento para Doença de Chagas". *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1:266-272, 1959.
- (8) Almeida, J. O. e Siqueira, A. F. "Estudo da Discrepância Relativa Entre Pares de Reações Simultâneas de Fixação de Complemento no Sistema Doença de Chagas". *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2:204-212, 1960.
- (9) Almeida, J. O. "Estudos Sobre a Reação de Fixação de Complemento em Brucelose.

- I. Influência da Ordem de se Misturar Antígeno, Anticorpo e Complemento, Sobre a Quantidade de Complemento Fixado". *Rev Inst Med Trop S Paulo* 9:63-72, 1967.
- (10) Almeida, J. O. "Estudos Sobre a Reação de Fixação do Complemento em Brucelose. II. Os Tipos Fundamentais de Suas Curvas de Isofixação". *Rev Inst Med Trop São Paulo* 9:397-414, 1967.
- (11) Baracchini, O., Costa, A. e Carloni, J. "Emprêgo do Calor e do Metanol no preparo de Antígeno de *Trypanosoma cruzi*". *Hospital (Rio)* 68:193-199, 1965.
- (12) Batista, M. S. e Santos, U. M. "Antígeno Metílico de Cultura de *Schizotrypanum cruzi*". *Hospital (Rio)* 56:1045-1051, 1959.
- (13) Chaffee, E. F., Bauman, P. M. e Shapilo, J. J. "Diagnosis of Schistosomiasis by Complement Fixation". *Amer J Trop Med* 3:905-913, 1954.
- (14) Freitas, J. L. P. e Almeida, J. O. "Nova técnica de Fixação de Complemento para Moléstia de Chagas. Reação Quantitativa com Antígeno Gelfificado de Culturas de *Trypanosoma cruzi*". *Hospital (Rio)* 35: 787-800, 1949.
- (15) Pangborn, M. C., Almeida, J. O., Maltaner, F., Silverstein, A. M. and Thompson, W. R. *Cardiolipin Antigens*. WHO Monogr Ser 6:26-52, 1955.
- (16) Rice, C. E. "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.
- (17) Rice, C. E. "Some Factors Influencing the Selection of a Complement-Fixation Method. I. A Comparison of Two Quantitative Techniques, and An Alternative Method of Expressing Serum Dilution Titer". *J Immunol* 59:95-106, 1948.
- (18) Richardson, G. M. "Preservation of Liquid Complement Serum". *Lancet* 2:696-697, 1941.
- (19) Thompson, W. R., Rice, E. C., Maltaner, E. and Maltaner, F. "Some Fundamental Notions in Estimation of Complement Fixation. I. General Relations and A Proposed Uniform Notation". *J Immunol* 62: 353-361, 1949.
- (20) Thompson, W. R. and Almeida, J. O. "Sequential Tests of Antigen Components. Influence of Technical Variability and of Producer Aim." *Ann Rep Div Lab Res New York State Dep Health* 35-36, 1955.
- (21) Wadsworth, A. B. *Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. 3a ed, Baltimore: Williams and Wilkins, 1947. Página 990.

Presencia del inhibidor específico de fijación de complemento en antígenos preparados con *Trypanosoma cruzi* (Resumen)

La titulación, mediante el método cuantitativo de fijación del complemento, de sueros de casos de enfermedad de Chagas comprobados por la presencia de parásitos, utilizando extractos acuosos y metílicos de *Trypanosoma cruzi* como antígenos, reveló una pronunciada discrepancia en los títulos. La inclinación entre las cantidades de suero y el número de unidades de complemento necesarias para la hemólisis de 50% expresaba el título del suero.

En cada caso, los títulos más elevados se obtuvieron con el antígeno metílico. Se observó también que cuando se agregaba antígeno acuoso al antígeno metílico, aquel producía una significativa disminución del título. Todo sugería la presencia de un hapteno, capaz de combinarse específicamente con anticuerpos chagásicos para formar complejos inmunes que no fijan el complemento.

Como el inhibidor era soluble en agua y casi insoluble en metanol, podía aislarlo como

extracto acuoso de tripanosomas anteriormente tratados con metanol. Este hapteno permitió obtener reacciones muy débiles de fijación de complemento con sueros chagásicos. No obstante, al agregarse al antígeno metílico se observó una poderosa inhibición. Esta inhibición se produjo sólo con suero chagásico y no con los de casos de sífilis, brucelosis, lepra o esquistosomiasis.

Se puede preparar un antígeno exento de inhibidor tratando los tripanosomas desecados, anteriormente delipidizados con benceno, con agua saturada con cloroformo. Los tripanosomas extraídos se desecan de nuevo y se agrega metanol. La extracción puede efectuarse en autoclave, a 121°C durante 10 minutos, o con vibración ultrasónica, a 20 KC/sec. El antígeno se mantiene a la temperatura ambiente.

En vista de que en el sistema antígeno-anticuerpo de Chagas, la frecuencia de las observaciones defectuosas en titulaciones séri-

cas duplicadas y simultáneas con los mismos reactivos, no es mayor que la observada en los sistemas contra la sífilis o la lepra, la reactividad específica de antígenos, preparados con

Trypanosoma cruzi, puede compararse de acuerdo con el mismo criterio utilizando el método de análisis progresivo aplicado a la estandarización de antígenos de cardiolipina.

Presence of Specific Complement-Fixation Inhibitor in Antigens Prepared from *Trypanosoma cruzi* (Summary)

Titration performed by the quantitative complement fixation method on sera from parasitologically confirmed Chagas' disease cases, using an aqueous or a methylic extract of *Trypanosoma cruzi* as antigen, revealed a marked discrepancy in titers. The serum titer was expressed by the slope of the regression line between amounts of serum and number of complement units needed for 50% hemolysis.

In every case, the highest titers were obtained with the methylic antigen. It was observed also that the aqueous antigen, when added to the methylic antigen, produced a significant drop in titer. Everything suggested the presence of an haptene, able to combine specifically with Chagasic antibodies to form immune complexes which do not fix complement.

Since the inhibitor was soluble in water and almost insoluble in methanol, it could be isolated as an aqueous extract from trypanosomes previously treated by methanol. This haptene gave very weak complement fixation reactions with Chagasic sera. However, when added to

the methylic antigen, a strong inhibition was observed. This inhibition was observed only with Chagasic sera, and not with sera from cases of syphilis, brucellosis, leprosy or schistosomiasis.

An antigen free of inhibitor can be prepared by treating the dried trypanosomes, previously delipidized by benzene, with water saturated with chloroform. The extracted trypanosomes are dried again and methanol is added. The extraction can be made in the autoclave, at 121° C for 10 minutes, or with ultrasonic vibration, at 20 KC/sec. The antigen is kept at room temperature.

Since, in the Chagas antigen-antibody system, the frequency of defective observations in duplicated and simultaneous serum titrations with the same reagents, is not higher than those found in the syphilis or leprosy systems, the comparison of the specific reactivity of antigens, prepared from *Trypanosoma cruzi*, can be made according to the same criteria using the sequential analysis method as applied to the standardization of cardiolipin antigens.

Présence d'un inhibiteur spécifique de fixation du complément dans les antigènes préparés à partir du *Trypanosoma cruzi* (Résumé)

Lorsqu'on titrait, au moyen de la méthode quantitative de fixation du complément, les sérum de cas de maladie de Chagas confirmés par la présence de parasites, en employant des extraits aqueux ou méthyliques de *Trypanosoma cruzi* comme antigène, on constatait une forte disparité entre les titres. L'inclinaison entre les quantités de sérum et le nombre d'unités de complément nécessaire pour une hémolyse de 50 pour cent dénotait le titre du sérum.

Dans chaque cas, les titres les plus élevés ont été obtenus avec l'antigène méthylique. Il a été également constaté que l'antigène aqueux, lorsqu'on l'ajoute à l'antigène méthylique, produit une baisse importante du titre. Tout indiquait la présence d'une haptène capable de se combiner particulièrement avec les anticorps de la maladie de Chagas afin de former des

complexes immuns qui ne fixent pas le complément.

Du fait que l'inhibiteur est soluble dans l'eau et presque insoluble dans le méthanol, il pouvait être isolé comme extrait aqueux à partir de trypanosomes traités auparavant par le méthanol. Cette haptène a donné des réactions très faibles de fixation de complément avec des sérum de la maladie de Chagas. Toutefois, lorsqu'on l'ajoutait à l'antigène méthylique, on constatait une forte inhibition. Cette inhibition n'a été enregistrée qu'avec des sérum de la maladie de Chagas et non avec des sérum provenant de syphilis, de brucellose, de lèpre ou de schistosomiase.

Un antigène débarrassé d'inhibiteur peut être préparé en traitant les trypanosomes séchés, délipidisés préalablement au moyen de benzène, avec de l'eau saturée de chloroforme. Les trypanosomes ainsi extraits sont séchés à

nouveau en ajoutant ensuite du méthanol. L'extraction peut être effectuée dans l'autoclave à 121 degrés centigrades pendant 10 minutes, ou par vibration ultrasonique, à 20 KC/sec. L'antigène est conservé à la température ambiante.

Etant donné que dans le système antigène-anticorps de la maladie de Chagas la fréquence des observations défectueuses dans les titrages répétés et simultanés de sérum avec les mêmes

réactifs n'est pas plus grande que celles constatées dans les systèmes de syphilis ou de lèpre, il peut être procédé à la comparaison de la réactivité spécifique des antigènes, préparés à partir du *Trypanosoma cruzi*, selon les mêmes critères, en utilisant la méthode de l'analyse séquentielle, telle qu'elle est appliquée à la normalisation des antigènes à base de cardiolipine.

EL ALCOHOLISMO Y LOS ACCIDENTES DE TRÁNSITO

La nueva Secretaría de Transportes de los Estados Unidos de América sometió un informe al Congreso de ese país sobre el alcohol y la seguridad en las vías públicas, en el cual se indica que el alcohol consumido por conductores y peatones ha contribuido a unos 25,000 accidentes fatales de tránsito y 800,000 choques de vehículos de motor, de unos 53,000 y 14 millones, respectivamente, ocurridos anualmente en el país durante los últimos años.

Según ese informe, la posibilidad de que los que han tenido choques automovilísticos después de haber estado bebiendo tengan padres alcohólicos es doble en comparación con los que también han chocado pero que no habían estado bebiendo; y triple, al compararlos con los que no han tenido colisiones. Es corriente que el alcohólico que ha tenido varios accidentes automovilísticos tenga, asimismo, antecedentes de otros actos de violencia, encontrándose características análogas entre unos y otros problemas. También se estima que existe una correlación entre la cantidad de alcohol ingerido y la gravedad del accidente.

El informe recomienda la formulación de métodos para hacer un examen colectivo de los conductores presuntamente embriagados y de aquellos aparentemente no embriagados pero que hayan violado las leyes de tránsito. Señala la necesidad de que se mejoren los servicios de emergencia y el diseño de automóviles y de las vías públicas. Esto no sugiere que se reduzca la lucha integral contra el consumo abusivo del alcohol en relación con el tránsito, sino más bien que se empleen todas las medidas prácticas posibles para reducir el sorprendente número de accidentes fatales que se registra en las vías públicas del país y otras manifestaciones de violencia en la sociedad. A este respecto, la Secretaría de Transportes subsidia con unos EUA\$3.6 millones más de 40 programas relacionados con el problema del alcohol. [Medical Tribune 9 (72): 4, 1968.]