A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NO DIAGNÓSTICO DA AMEBIASE (*)

AUGUSTO DE E. TAUNAY
Biologista do Instituto Adolfo Lutz

MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA
Médico do Serviço de Leishmaniose com exercício no Instituto Adolfo Lutz

GABRIEL GARCIA DE FIGUEIREDO
Técnico de laboratorio do Instituto Adolfo Lutz

Em 1927 Graig [1] demonstrou que o soro de doentes infectados com *Endamoeba hystolitica* continha anticorpos específicos capazes de fixar o complemento, quando se usa um antígeno especial obtido de culturas de *E. hystolitica*. A natureza exata desta reação de fixação do complemento até o presente não foi bem determinada, mas os resultados de seu emprego como método de diagnóstico e controle do tratamento têm sido bastante satisfatórios.

Experimentalmente [2] tambem já foi demonstrada a existência do anticorpos no sangue de animais sensíveis, tais como coelhos, gatos e cães inoculados com culturas, cistos lavados ou com o próprio antígeno de *E. hystolitica*. Stone, em 1935, inoculando coelhos por via intra-peritoneal com cistos vivos e lavados de *E. hystolitica* conseguiu demonstrar o aparecimento de anticorpos no sangue, já que as reações foram fortemente positivas.

Graig e Kagy chegaram ao mesmo resultado, inoculando formas vegetativas de *E. hystolitica* no cecum e ileum de cães. Meleney e Frye [3], em 1937, confirmaram as experiências anteriores, sendo que em coelhos injetavam antígeno amebiano. Estes mesmos autores, em *Macacus rhesus* infectados natural ou experimentalmente, obtiveram reações negativas coincidindo com ausência de lesões intestinais demonstráveis. Nesses mesmos animais quando inoculados com antígeno amebiano as reações de fixação do complemento foram positivas, se bem que de curta duração. Craig e Swartz

* Recebido para publicação em 23 de Fevereiro de 1942.

welder tendo infectado *Macacus rhesus* com culturas de *E. hystolitica* obtiveram reações positivas em todas, coincidindo com lesões amebianas intestinais.

O fato da reação tornar-se negativa depois da infestação ter sido eliminada tanto no homem como nos animais de experiência, é outro argumento em favor da existência de anticorpos específicos no sangue, demonstráveis pela reação de fixação do complemento. Apesar de ser um processo de diagnóstico divulgado há 14 anos, o seu emprego não entrou na prática corrente, pela dificuldade que há em serem preparados bons antígenos. Entre nós não nos consta que tenha sido feita qualquer observação nesse sentido, o que justifica a presente comunicação.

Passamos a descrever as técnicas empregadas, necessárias à execução da reação de fixação de complemento no diagnóstico da amebiase.

PREPARO DO ANTÍGENO

O antígeno, por nós utilizado, foi conseguido a partir de culturas ricas de *E. hystolitica,* tratadas pelo álcool conforme preconisa Craig.

Na obtenção de culturas ricas inicialmente usamos o meio de Boeck-Drbohlav e um meio composto de soro de boi, coagulado, líquido de Locke e uma pitada de amido de arroz. As fezes foram semeadas conforme a técnica de Craig, isto é, sempre em quantidade suficiente e sem qualquer tratamentos prévio. Das várias semeaduras realizadas com material rico em cistos ou trofozoitos, apenas algumas culturas foram conseguidas após 48 horas de estufa a 37°, culturas pobres que não atingiam a média de uma ameba por campo. (400 ×) O crescimento bacteriano, muito intenso, tornava o meio impróprio perecendo as culturas em 72 horas, sem haver possibilidade de repique. Tratamos o material a ser semeado com diferentes antisséticos, tais como: lugól, ácido clorídico, nipagina, prata coloidal, etc., mas os resultados sempre foram maus. Snyder e Meleney[4] lavam o material a ser semeado e fazem a flutuação dos cistos com sulfato de zinco (densidade 1130). Com o intúito de obtermos um número apreciavel de cistos com a menor quantidade possivel de germes, utilizamos o processo de Faust para enriquecimento das fezes: após a flutuação na solução do sulfato de zinco, pipetamos cuidadosamente a parte superior da solução onde se encontram os cistos, lavamos várias vezes em solução fisiológica e praticamos

as semeaduras. Conseguimos por este processo culturas com 5 trofozoitos em média por campo, com crescimento quasi nulo de germes em 48 horas de estufa a 37°. A partir destas culturas foram feitos repiques cada 24 horas, que nos serviram na preparação do antígeno. Em média, não conseguimos ultrapassar de seis o número de repiques, morrendo as culturas na última passagem. O meio que nos deu melhor resultado foi o de soro de boi, coagulado, acima descrito.

Para preparar o antígeno, aspira-se por meio de uma pipeta toda a parte líquida do meio, tendo-se o cuidado de lavar a parte sólida com solução fisiológica. O material assim obtido é centrifugado a 3.000 rotações e o sedimento tratado pelo álcool absoluto na proporção de 1 de sedimento para 7,5 volume de álcool. Guardar em vidro nêutro durante 15 dias na estufa a 37°, tendo-se o cuidado de agitá-lo varias vezes por dia, conforme a técnica descrita por Craig. Decorridos os 15 dias o antígeno é filtrado em papel de filtro, e está pronto a ser usado após os necessários controles.

Conforme demonstrou Graig, o fato de haver no antígeno substâncias extraidas das amebas e dos germes que tambem vegetam nas culturas, não depõe contra a especificidade do mesmo, uma vez que o citado autor provou que tais bactérias, quando cultivadas isoladamente e feita a extração pelo álcool, não acarretam a fixação do complemento no soro de doentes com infestação amebiana, resultados estes confirmados por outros autores. Stone, usando um antígeno livre de bactérias, obtido pela extração de cistos lavados, conseguiu resultados semelhantes aos obtidos com antígeno preparado de culturas contendo amebas e bactérias.

Uma vez pronto o antígeno devemos dosar suas propriedades antigênicas e, principalmente, verificar se não tem ação anti-complementar e hemolítica. Com os antígenos por nós preparados, achamos que tinham melhor ação quando usados diluidos em solução fisiológica do que puros, tendo sido empregados na diluição de 1:30.

TITULAÇÃO DO ANTÍGENO

1) Preparar diferentes diluições do antígeno da seguinte maneira: a um tubo grande contendo 4 cc. de solução fisiológica juntar 1 cc. de antígeno, gota a gota, com agitação, para termos uma diluição final 1:5.

Preparar as diluições seguintes, juntando:

2 cc. de 1:5	+ 2 cc. de sol. fisiológica	=	1:10
2 cc. de 1:10	+ 2 cc. " " "	=	1:20
2 cc. de 1:20	+ 2 cc. " " "	=	1:40
2 cc. de 1:40	+ 2 cc. " " "	=	1:80

2) Dispor 4 séries de tubos contendo 4 tubos em cada série. Nos 4 tubos da primeira série colocar 0,5 cc. de antígeno diluido a 1:10; nos 4 tubos da segunda colocar 0,5 de antígeno a 1:20; nos 4 tubos da terceira colocar 0,5 cc. de antígeno a 1:40 e nos 4 tubos da quarta colocar 0,5 cc. de antígeno a 1:80.

3) Preparar as seguintes diluições de um soro fortemente positivo: 1:5 — 1:10 — 1:20 — 1:40. Juntar ao primeiro tubo de cada série 0,5 cc. de soro diluido a 1:5, ao segundo tudo 0,5 cc. de soro diluido a 1:10, ao terceiro 0,5 cc. de soro diluido a 1:20 e ao quarto 0,5 cc. de soro diluido a 1:40. Agitar levemente todos os tubos e deixar em repouso 15 minutos.

4) Juntar 1 cc. do complemento a todos os tubos, contendo 2 unidades cheias de complemento.

5) Colocar na estante um tubo controle de soro contendo 0,5 cc. de soro diluido a 1:5 e 1 cc. de complemento (2 unidades cheias), e um controle de sistema hemolítico contendo 1 cc. de solução fisiológica e 1 cc. de complemento (2 unidades cheias).

6) Agitar levemente todos os tubos e colocar na estufa a 37° durante 90 minutos.

7) Juntar 1cc. de glóbulos de carneiro sensibilizados a todos os tubos. Agitar novamente e colocar na estufa a 37°. Fazer a leitura.

8) A dose ótima do antígeno a ser usada é aquela que produz inhibição completa da hemólise com as menores diluições de soro.

TITULAÇÃO DO PODER ANTI-COMPLEMENTAR DO ANTÍGENO

1) Preparar uma série de 6 tubos aos quais se juntam 0,5 cc. de antígeno diluido a 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 nos 5 primeiros e 0,5 cc. de solução fisiológica no último tubo.

2) Juntar a cada tubo 0,5 cc. de soro normal inativado diluido a 1:10.

3) Juntar 2 unidades cheias de complemento a cada tubo. Estufa a 37° durante uma hora.

4) Juntar 1 cc. de glóbulos de carneiro sensibilizados a cada tubo. Em todos os tubos deve haver hemólise total; se em qualquer tubo contendo antígeno houver inhibição da hemólise, o antígeno não deve ser usado.

Em todas as nossas reações empregamos um sistema hemolítico composto de glóbulos de carneiro e soro de coelho anti-carneiro. Preferimos empregar glóbulos de carneiro previamente sensibilizados e que consiste em misturar 15 a 20 minutos antes de serem usados glóbulos e amboceptor em proporções exatas.

E' de grande importância usar sempre complemento com título exato para se poder apanhar as menores inhibições da hemólise. Empregamos para dosagem do complemento a técnica descrita por Kolmer [5] e que consiste no seguinte: diluir o complemento puro a 1:30 em solução fisiológica e distribuir numa série de 10 tubos da seguinte maneira:

Complemento diluido a 1:30		Antígeno	Sol. fisiológica	S. hemolítico
1	0,10	0,5 cc.	1,4 cc.	1 cc.
2	0,15	0,5 cc.	1,4 cc.	1 cc.
3	0,20	0,5 cc.	1,3 cc.	1 cc.
4	0,25	0,5 cc.	1,3 cc.	1 cc.
5	0,30	0,5 cc.	1,2 cc.	1 cc.
6	0,35	0,5 cc.	1,2 cc.	1 cc.
7	0,40	0,5 cc.	1,1 cc.	1 cc.
8	0,45	0,5 cc.	1,1 cc.	1 cc.
9	0,50	0,5 cc.	1,0 cc.	1 cc.
10	0,00	0,5 cc.	2,5 cc.	1 cc.

A menor quantidade de complemento diluido 1:30 que produzir hemólise total é a unidade exata. O tubo seguinte é a unidade cheia que contem, 0,05 cc. a mais de complemento diluido. Para a reação empregar 2 unidades cheias, diluindo de tal maneira que 1 cc. contenha as 2 unidades cheias.

O cálculo é muito simples, por exemplo:

Unidade exata — 0,5 cc.
Unidade cheia — 0,35 cc.

Dose certa (2 unidades cheias) — 0,7 cc.

Para saber qual a diluição a ser feita para que 1cc. contenha 2 unidades cheias basta dividir 30 pela dose, no caso $\frac{30}{0,7} = 43$,

portanto a diluição do complemento é de 1:43, contendo em 1cc. 2 unidades cheias.

TECNICA DA REAÇÃO

Depois de serem verificadas as quantidades exatas dos vários elementos a serem usados na reação, como acima descrevemos, a técnica da reação propriamente dita, por nós usada, foi a seguinte: para cada soro a ser examinado dispor 3 tubos de ensaio contendo as seguintes quantidades de solução fisiológica: 0,9 cc. — 0,5 cc. e 0,5 cc.

No tubo número 1 juntar 0,6 cc. de soro inativado a 56° durante 30 minutos. Misturar e transferir 0,5 cc. para os tubos número 2 e 3. Depois de misturar o tubo número 2, tirar 0,5 cc. e despresar. Os tubos 1 e 2 contêm, respectivamente, 0,2 e 0,1 cc. de soro no volume total de 0,5 cc.. O tubo número 3 não recebe antígeno e serve como testemunha do soro.

Colocar 0,5 cc. da diluição certa de antígeno nos tubos 1 e 2,. Deixar em repouso 10 a 30 minutos e juntar 2 unidades cheias de complemento em todos os tubos.

Agitar levemente e colocar na estufa a 37° noventa minutos. Findo esse prazo juntar 1 cc. de glóbulos de carneiro a 5% previamente sensibilizados.

Colocar novamente na estufa e fazer a leitura após 15 minutos. Ao mesmo tempo, preparar outras séries de tubos testemunhas, contendo soro negativo e soro positivo, cuja disposição será a mesma do soro suspeito. Colocamos tambem nesta estante um tubo testemunha do sistema hemolítico que não leva soro e sim solução fisiológica.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Fortemente positiva:	inhibição total nos 2 tubos da reação	(++++)
Moderadamente " :	" " só no 1.º tubo " "	(+++)
Fracamente " :	" parcial em 1 ou ambos os tubos da reação	(++)
Duvidosa:	inhibição parcial só no 1.º tubo da reação	(+)
Negativa:	hemólise completa em ambos os tubos	(—)

Todos os casos observados foram acompanhados por rigoroso controle pelo exame das fezes, visando a ocorrência da *E. hysto-*

litica, exame este consistindo no exame direto do material a fresco, enriquecimento pelo processo de Faust, esfregaços corados pela hematoxilina férrica e cultura (casos duvidosos, casos negativos e tal após 5 exames de fezes completos executados em períodos difealguns positivos). Os casos negativos só foram considerados como rentes. Grande parte do material enviado e seus respectivos exames devemos à gentilesa do Dr. Dácio Franco do Amaral e do Dr. Ávila Pires, a quem consignamos os nossos agradecimentos. Contamos com um total de 82 observações cujos resultados comparativos entre a reação e o exame das fezes se dispõem conforme o quadro abaixo:

R. F. C.	+	—	—	+
Ex. das fezes .	+	—	+	—
N.º de casos ..	66	13	2	1
Porcentagem ..	80,48%	15,85%	2,44%	1,22%

Vemos, pois, que em 79 reações, ou seja 96,34 %, houve concordância com o exame das fezes, enquanto em 3 ou seja 3,66 % os resultados foram discordes.

Em três casos, desde o início a reação foi fortemente positiva ao passo que o exame das fezes era negativo; num dos casos positivou-se no segundo exame e nos outros dois, somente no terceiro. Ocorrência interessante verificou-se quando usamos o soro de pessoa suposta sã, como testemunha da reação, obtivemos uma reação fortemente positiva. Feito o controle, 3 exames sucessivos foram negativos, tendo-se porem encontrado formas vegetativas de *E. hystolitica* pela cultura, após 96 horas de estufa.

Quanto à variação da intensidade da reação com o tratamento, dispomos de pequeno número de observações, todas concordes em patentear a redução de sua intensidade embora nenhuma se tenha tornado negativa.

Como podemos constatar os nossos resultados são bons, o que nos anima a prosseguir, com o fim de obter maior número de observações.

RESUMO

Os A. A., após acentuarem que não encontraram na bibliografia nacional nenhum trabalho referente ao assunto, descrevem a técnica por eles empregada para cultura da *E. hystolitica* usando o meio de soro de boi coagulado mais líquido de Locke.

Descrevem a seguir as técnicas usadas para extração do antígeno e verificação do seu poder antigênico e anti-complementar; os antígenos têm sido usados diluidos a 1:30 em sol. fisiológica.

Relatam a técnica empregada na reação, sua interpretação e os resultados obtidos em confronto com os exames das fezes (direto, enriquecimento pelo Faust, coloração pela hematoxilina férrica e cultura). Foram considerados negativos para *E. hystolitica* nas fezes, somente os casos nos quais foram executadas 5 séries de exames em diferentes ocasiões. De 82 reações houve concordância com exame das fezes em 79 ou seja 96,34 % enquanto em 3 ou seja 3,66% os resultados foram discordes, conforme discrimina o quadro anexo.

ABSTRACT

The authors, after pointing out that there was found no publication about the subject in the national literature, describe the technique used for the culture of *E. hystolitica,* using coagulated beef serum and loke's solution.

Afterwards they describe the techniques used for the extraction of the antigen and the verification of the antigen and anti-complementary power, the antigens having been used dissolved at 1:30 in physiologic solution.

They report the technique used in the reaction, its interpretation, and the results obtained, in comparison with those of the examination of stool (direct examination, Faust's enrichment method, iron hematoxylin stain and culture). There were considered negative for *E. hystolitica* in stool only those cases in which there were made 5 series of tests performed at different occasions. There was an accordance with the stool examination in 79 cases out of 82 tested, or 96,34%, while in 3, or 3,66 % the results disagreed, as seen in the joined table.

BIBLIOGRAFIA

1 — GRAIG, E. F. — Amebiasis and amebic disentery, C. C. Thomas Springfield, 1934, I.

2 — GRAIG, E. F. — Laboratory diagnosis of protozoan diseases, Lea a Febiger, 1942.

3 — MELENEY, H. E. & FRYE, W. W. — 1937, *Am. Jour. Public Health*, 27, 505.

4 — SNYDER, T. L. & MELENEY, H. E. — 1941, *Am. Jour. Trop. Med.*, 21, 63.

5 — KOLMER, J. H. & BOENER, F. — Approved Laboratory technic — D. Appleton-Century Company, 1941.