

EMPREGO DA TÉCNICA DE KOLMER, MODIFICADA, NA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO, USANDO ANTÍGENO METÍLICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

MODIFIED KOLMER COMPLEMENT FIXATION TEST, USING METHANOLIC ANTIGEN OF *TRYPANOSOMA CRUZI*, IN CHAGAS' DISEASE DIAGNOSIS

OCTAVIO BARACCHINI ⁽¹⁾
MANOEL DE BRITTO E SILVA ⁽²⁾

SUMMARY

A modified Kolmer complement fixation test using methanolic antigen of *T. cruzi* prepared according Baracchini *et alii*, 1966 is described. The related test was adapted for the use of methanolic antigen of *T. cruzi*, that nowadays is the more practical because of its stability at room temperature, economy, rapid and easy preparation, besides its good especificity and sensibility.

The principal aim of the authors is just to give the possibility of any laboratory, to work on Chagas' disease serology using a simple and good technique.

INTRODUÇÃO

A sorologia da Doença de Chagas é uma das solicitações mais constantes nos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo e do Brasil. Essa demanda cresce dia a dia em função da maior atenção dispensada pelas autoridades sanitárias brasileiras ao importante problema da infecção chagásica. Necessário é, portanto, que se desenvolvam técnicas sorológicas seguras e de fácil execução, para que qualquer laboratório com atividade polivalente possa participar ativamente no levantamento sorológico da doença de Chagas na comunidade brasileira.

O presente trabalho visa justamente a descrição de uma técnica proposta por KOLMER⁶ para o sistema sífilis. A referida técnica foi adaptada para o sistema Chagas, usando-se como antígeno, o antígeno metílico preparado segundo BARACCHINI *et alii*³.

Os estudos comparativos realizados entre a técnica que apresentamos (com 100% de hemólise) e a de FREITAS & ALMEIDA⁵ (com 50% de hemólise) e com testes de imunofluorescência, permitiram a sua indicação para a rotina dos trabalhos sorológicos da Doença de Chagas nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz.

A introdução do antígeno metílico de *T. cruzi* na sorologia na Doença de Chagas por BATISTA & SANTOS⁴ e BARACCHINI *et alii*³, modificou por completo a situação do diagnóstico sorológico da infecção chagásica. Anteriormente à publicação dos autores citados, poucos eram os laboratórios que podiam trabalhar em sorologia da doença de Chagas, pois os antígenos aquosos utilizados, apesar da boa especificidade, não são estáveis, são pouco econômicos e de preparo demorado.

Além disso, como verificaram ALMEIDA¹ e ALMEIDA *et alii*², os antígenos

(1) Professor Catedrático de Microbiologia e Saúde Pública da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto e Biologista do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Médico Chefe da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz.

aquosos de *T. cruzi* são menos sensíveis do que os antígenos metílicos e ainda são ricos em inibidores específicos para a infecção chagásica quando empregados em testes de reação de fixação de complemento.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do sôro

Após a colheita e a coagulação do sangue, o sôro é separado por centrifugação e inativado pelo aquecimento a 56°C, durante 30 minutos. Os soros previamente inativados devem ser reaquecidos a 56°C, por 10 minutos, no dia da prova. O sôro que apresentar partículas em suspensão após a inativação deve ser novamente centrifugado.

No caso especial de o sôro humano normal conter anticorpos hemolíticos naturais para os glóbulos de carneiro, êsses anticorpos podem ser removidos empregando-se a seguinte técnica:

a) Coloca-se 1 ml de sôro humano em um tubo de 75 x 12 mm e leva-se êste tubo ao refrigerador a + -4°C, durante 15 minutos.

b) Ao sôro em questão adiciona-se uma gôta de papa de glóbulos de carneiro lavados e concentrados.

c) Leva-se novamente o tubo ao refrigerador por mais 15 minutos.

d) Após a incubação em geladeira, o sôro tratado pelos glóbulos de carneiro é centrifugado e o sobrenadante estará pronto para o uso.

Sôro anticomplementar

O sôro anticomplementar pode ser novamente testado preparando-se diluições seriadas em progressão geométrica. Para cada diluição do sôro são preparados dois tubos; um, funcionando como tubo testemunha e o outro, de reação. A primeira diluição que apresentar, na prova qualitativa, hemólise completa no tubo testemunha e reação fortemente positiva, no tubo reação, permite concluir que se trata de um sôro *reagente*; caso contrário, o sôro é dotado de forte atividade anticomplementar.

Glóbulos de carneiro

Os glóbulos de carneiro podem apresentar maior ou menor resistência à ação hemolítica do complemento e da hemolisina. Como os glóbulos de carneiro participam na reação como indicador da fixação do complemento no complexo antígeno anticorpo, é necessário estabelecer-se um controle adequado dêste componente da reação.

A contaminação bacteriana tem papel importante na conservação dos glóbulos de carneiro e daí a importância de se trabalhar nas melhores condições de assepsia possível desde a colheita dos glóbulos até a sua utilização final.

Colheita do sangue

Sangrar o carneiro na veia jugular, com todos os cuidados de assepsia, colhendo o sangue diretamente sobre a solução citratada (B.R.K.) na proporção de 1/1.

Solução B.R.K.

Citrato de sódio	8,0 g
Cloreto de sódio	4,2 g
Glicose anidra	20,5 g
Solução 10% de ácido cítrico	8,0 ml
Água destilada q. s. p.	1 000,0 ml

Ajustar o pH a 6.1 com solução de ácido cítrico. Esterilizar em autoclave a 110°C, por 15 minutos. Juntar então 0,002 g de estreptomicina para cada ml de solução.

Tampão de barbitúrico (5 vezes isotônico)

Cloreto de sódio	83,80 g
Bicarbonato de sódio	2,52 g
Dietilbarbiturato de sódio	3,0 g
Ácido dietilbarbitúrico	4,5 g
Água destilada q.s.p.	2 000,0 ml

Dissolver o ácido dietilbarbitúrico em 500 ml de água destilada quente e adicionar à solução os outros componentes. Esfriar e completar o volume.

Para o preparo da solução tampão, tomar 200 ml da fórmula 5 vezes isotônica e completar o volume para 1 000 ml com água destilada.

Preparo da suspensão de glóbulos padronizada

1. Os glóbulos de carneiro devem ser conservados em geladeira e só usados 48 horas após a colheita em solução B.R.K., 1/1.

2. Os glóbulos de carneiro, antes de serem utilizados, devem ser filtrados em gaze.

3. Os glóbulos filtrados são diluídos em solução tampão na proporção de 1/3. Os tubos são centrifugados a 2 000 r.p.m., durante 5 minutos.

4. Decanta-se o sobrenadante, procurando-se retirar também os glóbulos brancos que constituem a parte superior do sedimento.

5. Adiciona-se nova quantidade de solução tampão, ressuspendem-se os glóbulos e os tubos são novamente centrifugados. Esta operação deve ser repetida mais duas vezes.

6. Após a última lavagem dos glóbulos, estes são transferidos para tubos graduados de 15 ml e centrifugados a 2 000 r.p.m., durante 15 minutos.

7. Lê-se o volume dos glóbulos sedimentados nos tubos graduados de 15 ml e retira-se cuidadosamente o líquido sobrenadante.

8. Com o sedimento, prepara-se uma suspensão de glóbulos, a 2%, multiplicando-se por 49 o resultado da leitura do sedimento no tubo graduado.

Suponhamos que a leitura do sedimento no tubo graduado foi igual a 2,1 ml. Então, $2,1 \text{ ml} \times 49 = 102,9 \text{ ml}$ de solução tampão necessária para se obter uma suspensão, a 2%, de glóbulos de carneiro.

9. Coloca-se exatamente 15 ml de suspensão de glóbulos, a 2%, em um tubo graduado de 15 ml e centrifuga-se, durante

10 minutos, a 2 000 r.p.m. Se a suspensão de glóbulos estiver convenientemente preparada, ela produzirá um sedimento igual a $0,3 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$.

Nota: Quando o volume dos glóbulos está aquém ou além dos limites estabelecidos, deve-se corrigir a concentração dos mesmos. A fórmula abaixo permite estabelecer a quantidade de tampão que deve ser eliminada ou adicionada à suspensão de glóbulos.

Exemplo 1

Volume da suspensão de glóbulos a 2% = 100 ml

Leitura obtida em tubo graduado de 15 a 1 = 0,27 ml

$$\frac{0,27 \text{ ml}}{0,3 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 90 \text{ ml}$$

Assim, da suspensão de glóbulos a 2% preparada, devem ser retirados 10 ml de líquido sobrenadante.

Exemplo 2

Volume da suspensão de glóbulos = 100 ml

Leitura obtida no tubo graduado de 15 ml = 0,33 ml

$$\frac{0,33}{0,3} \times 100 = 110 \text{ ml}$$

A suspensão de glóbulos de carneiro preparada deve-se adicionar 10 ml de solução tampão.

10. A suspensão de glóbulos de carneiro deve ser conservada em geladeira e antes do seu uso o recipiente deve ser agitado convenientemente, a fim de assegurar uma suspensão uniforme.

A suspensão de glóbulos de carneiro pode também ser padronizada colorimetricamente da maneira seguinte:

a) Após a última lavagem dos glóbulos de carneiro em tubo graduado, ler o volume do sedimento e multiplicar por 49.

O resultado traduz a quantidade de solução tampão a ser adicionada ao sedimento para se ter uma suspensão de glóbulos a 2%.

b) Tomar 0,2 ml da suspensão de glóbulos e adicionar a 1,8 ml de água destilada, em um tubo (12 x 75). Medir a densidade ótica pelo fotômetro (Evans) usando filtro 530 (verde-amarelo), tendo como *blank* água destilada, ajustado a densidade ótica zero.

c) A densidade ótica de uma suspensão a 2% de glóbulos de carneiro oscila entre 0,24 e 0,27.

d) Se a densidade estiver fora desses limites, acertar o volume da suspensão aplicando a seguinte fórmula:

$$V. = \frac{V_o \times D_o}{0,26}$$

onde:

V. é o volume desejado.

V_o é o volume preparado.

D_o é a densidade ótica média.

e) Quando D_o é maior do que 0,27, corrigir a suspensão, juntando solução tampão num volume igual (V. — V_o).

f) Quando D_o é menor do que 0,24, a suspensão está muito diluída; então V. é menor do que V_o. Neste caso, deve-se retirar por centrifugação da suspensão de glóbulos uma quantidade de solução tampão igual (V_o — V.).

g) Depois de corrigida a suspensão, determinar novamente a densidade ótica como em b. Uma vez verificada a correção, a suspensão deve ser conservada em geladeira até o seu uso dentro de 24 horas.

Titulação da hemolisina

Diluir a hemolisina a 1/100 como segue:

Hemolisina glicerizada . . .	2 ml
tampão	94 ml
fenol a 5% em salina	4 ml

Da solução estoque, preparar diluição a 1/1 000 de hemolisina adicionando num tubo de ensaio 4,5 ml de tampão, mais 0,5 ml da solução estoque. Agitar bem, colocar numa estante 10 tubos de ensaio (12 x 75, numerados de 1 a 10. Pipetar 0,5 ml da solução de hemolisina a 1/1 000 nos primeiros 5 tubos. A seguir, proceder como no quadro I.

QUADRO I

Tubo n.º	Hemolisina 1/1 000 ml	Solução tampão ml	T é c n i c a	Diluição
1	0,5	0	1: 1.000
2	0,5	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1: 2.000
3	0,5	1,0	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 6 - desprezar 0,5 ml	1: 3.000
4	0,5	1,5	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 7 - desprezar 1 ml	1: 4.000
5	0,5	2,0	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 8 - desprezar 1,5 ml	1: 5.000
6	0	0,5	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 9	1: 6.000
7	0	0,5	misturar e transferir 0,5 ml ao tubo 10	1: 8.000
8	0	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1:10.000
9	0	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1:12.000
10	0	0,5	misturar e desprezar 0,5 ml	1:16.000

Adicionar 0,3 ml de 1 diluição de complemento a 1:30 a cada um dos tubos.

Adicionar 1,7 ml de tampão a cada tubo e 0,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

Agitar bem e colocar a estante com os tubos em banho-maria a 37°C por 60 minutos.

Leitura

O tubo contendo a diluição mais alta de hemolisina que apresentar hemólise total conterá uma unidade de hemolisina.

Do resultado obtido, a hemolisina 1:100 será diluída de maneira a conter 5 unidades em 0,5 ml. Por exemplo: se a diluição mais alta de hemolisina que deu hemólise completa foi a diluição 1: 4 000, indica que 0,5 ml contem *uma unidade*. Então 0,5 ml da diluição 1:800 contém 5 unidades.

Assim, 10 ml da solução de hemolisina a 1:100 mais 70 ml de tampão seria a diluição a ser empregada na reação.

Complemento

Esse componente da reação é o mais instável de todos e o maior responsável pelos problemas que ocorrem nas reações de fixação de complemento. Atualmente, o comércio especializado dispõe desse elemento que é conservado no estado liofilizado; no entanto, antes do seu emprego na reação propriamente dita, recomendamos a sua re-titulação.

Titulação do complemento

Adicionar 1 ml de complemento a 29 ml de tampão.

Colocar numa estante 10 tubos (12 x 75) numerados de 1 a 10. Seguir o quadro II.

QUADRO II

Titulação do complemento

Tubo n.º	Complemento 1:30	Antígeno diluído	Solução tampão	Incubação	Hemolisina	Glóbulos de	Incubação
1	0,10	0,5	1,4	1 hora a 37°C — Banho-maria	0,5	0,5	1/2 hora a 37°C — Banho-maria
2	0,15	0,5	1,4		0,5	0,5	
3	0,20	0,5	1,3		0,5	0,5	
4	0,25	0,5	1,3		0,5	0,5	
5	0,30	0,5	1,2		0,5	0,5	
6	0,35	0,5	1,2		0,5	0,5	
7	0,40	0,5	1,1		0,5	0,5	
8	0,45	0,5	1,1		0,5	0,5	
9	0,50	0,5	1,0		0,5	0,5	
10	—	—	2,5		—	0,5	

Determinar a menor quantidade de complemento que dá hemólise completa. Esta será a *unidade exata do complemento*. A unidade cheia contém 0,05 ml a mais de

complemento. Duas unidades cheias são requeridas para o teste propriamente dito. Estas podem ser determinadas como no quadro III.

QUADRO III

Complemento 1:30 ml	Hemólise	Unidade do Complemento
0,50	completa	—
0,45	completa	cheia
0,40	completa	exata
0,35	parcial	—
0,30	não houve	—
0,25	não houve	—

Para se determinar a quantidade de complemento que deve ser empregada de maneira a conter *duas unidades* cheias em

1 ml, de acordo com o exemplo dado, procede-se da seguinte maneira:

1 unid. exata = 0,4 ml compl. 1:30
 1 unid. cheia = 0,45 ml compl. 1:30
 2 unid. cheias = 0,90 ml compl. 1:30

$$\frac{30}{0,9} = 1,33$$

Assim, 1 parte do complemento mais 32 partes de tampão dará a diluição 1:33.

No teste propriamente dito não se recomenda empregar 2 unidades cheias de complemento em diluição inferior a 1:30 e nem superior a 1:43.

Nota — A substituição de duas unidades cheias de complemento por duas unidades exatas aumenta a sensibilidade da reação, porém, aumenta também a possibilidade de reações cruzadas. No entanto, achamos válida principalmente para os Serviços de Banco de Sangue.

Reação de Kolmer modificada

QUADRO IV

Tubo de reação ml	Tubos de controle				
	sêro ml	Antígeno ml	Sistema hemolítico ml	Glóbulos ml	
Solução tampão	0	0,25	0,1	0,35	0,85
Sêro do paciente	0,1	0,1	0	0	0
Antígeno	0,25	0	0,25	0	0
Encubar	Temperatura ambiente — 15 minutos				
Complemento (2 unidades cheias)	0,5	0,5	0,5	0,5	0
Encubar	Banho-maria 37°C — 90 minutos				
Hemolisina (5 unidades)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Glóbulos carneiro a 2%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Encubar	Banho-maria 37°C — 30 minutos e leitura				

O sôro contrôle deve apresentar hemólise completa dos glóbulos de carneiro.

Os resultados da reação pròpriamente dita poderão ser fornecidos pela quantidade de complemento fixado:

Nenhuma hemólise	=	reagente
25% de hemólise	=	reagente
50% de hemólise	=	reagente
75% de hemólise	=	reagente
95% de hemólise	=	fracamente reagente
100% de hemólise	=	não reagente

Observações

1. O tubo de contrôle do sôro deverá apresentar hemólise total. O tubo contrôle do antígeno deverá apresentar hemólise total. O tubo contrôle do sistema hemolítico deverá apresentar hemólise total. O tubo contrôle dos glóbulos de carneiro *não* deverá apresentar qualquer hemólise.
2. As reações positivas podem ser tituladas pela diluição do sôro a 1/2 — 1/8 — 1/16 — 1/32 etc. O resultado será fornecido: sôro reagente a 1/4 ou 1/32 etc.

RESUMO

Os autores apresentam uma reação de fixação de complemento com 100% de hemólise para o sistema Chagas, empregando, como antígeno, o antígeno metílico preparado segundo Baracchini *et alii*, 1966.

O principal objetivo dos autores dêste trabalho é possibilitar a qualquer laborató-

rio de sorologia trabalhar em doença de Chagas com uma técnica sorológica simples e segura.

A referida técnica é a que vem sendo empregada nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, onde vários estudos comparativos já foram realizados, tanto com outras técnicas, como a de Freitas e Almeida, 1949, como com reações de imunofluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. O. — Interpretation de los titulos de las reaciones quantitativas de la fijacion del complemento en el sistema enfermedad de Chagas. Bolm. Chil. Parasit. 24(1-2):77-83, 1969.
2. ALMEIDA, J. O.; PRATA, A.; ARJONA, A. C. & ARANTES, J. B. — Presença de inibidor específico de fixação de complemento em antígenos preparados de *Trypanosoma cruzi*. Bolm. Of. Sanit. Pan-am. 66(4):304-14, 1969.
3. BARACCHINI, O.; COSTA, A. & CARLONI, J. — Emprêgo do calor à temperatura de 120°C e do metanol no preparo do antígeno de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 70(1):97-100, 1966.
4. BATISTA, M. S. & SANTOS, U. M. — Antígeno metílico de *Schizotrypanum cruzi*. Hospital, Rio de J. 56:1045-51, 1959.
5. FREITAS, J. L. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação de complemento para moléstia de Chagas (Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 35:787-800, 1949.
6. KOLMER, J. A.; SPAULDING, E. H. & ROBSON, H. W. — Approved laboratory technic. 5. ed. New York, Appleton, 1951.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1970

