

**ESTUDOS SOBRE A REAÇÃO DE GUERREIRO-MACHADO.  
EFEITOS DA INATIVAÇÃO DO SORO CHAGÁSICO NA  
FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM ANTÍGENO DE  
*TRYPANOSOMA CRUZI*.**

**JOSÉ OLIVEIRA DE ALMEIDA  
THEREZINHA APARECIDA CUNHA**

*O aquecimento de soros chagásicos a 56°C por 30 minutos, não só inativa o complemento, como altera a mobilidade iônica das proteínas séricas. Com a inativação, os títulos dos soros por fixação de complemento decrescem, sendo a queda do poder fixador relacionada com a diminuição da avidéz do complexo-imune, formado com o antígeno de Trypanosoma cruzi, para o complemento. Não se observaram diferenças na reatividade específica dos soros chagásicos, antes e depois de inativados, quando os títulos foram determinados por técnicas que não envolvem o complemento, tais como a imunofluorescência e a hemaglutinação.*

As reações de fixação de complemento, como a de Guerreiro & Machado (1913) empregam, em sua maioria, o soro aquecido a 56°C por 30 minutos, para inativar o complemento. Os soros inativados são postos a reagir com a dose de máxima reatividade do antígeno e com quantidade conhecida de complemento.

No entanto, as reações de fixação de complemento com soro ativo seriam mais sensíveis, na experiência de Gradwohl (1917) e Kolmer et al (1920). Esses autores admitiam haver uma labilidade ao calor dos anticorpos sífilíticos e então os resultados com o soro aquecido revelariam somente os anticorpos termo-resistentes.

A alteração da reatividade específica dos soros não era uma particularidade de soros sífilíticos, tendo sido observada em soros chagásicos, de tuberculose e de lepra (Almeida et al, 1953; Almeida, 1963).

Técnicas de fixação de complemento com soro ativo, foram propostas para o diagnóstico da moléstia de Chagas por Nussenzweig (1953) e por Nussenzweig & Almeida (1954) e mais recentemente por Faria (1980) para exclusão de doadores de sangue chagásicos.

Trabalho realizado no Dept<sup>o</sup> de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Caixa Postal 301, 14100 Ribeirão Preto, São Paulo.

Recebido para publicação em 10 de março e aceito em 1<sup>o</sup> de abril de 1981.

Neste trabalho confirmamos a queda da reatividade específica em fixação do complemento, pela inativação, empregando dois métodos, um estático e outro cinético. Os títulos dos soros foram relacionados com a avidéz do complexo imune para o complemento. Não se observaram diferenças significativas nos títulos dos soros chagásicos, antes e depois da inativação, determinados por técnicas que não envolvem complemento, tais como a imunofluorescência e hemaglutinação, contrariando assim a hipótese da labilidade térmica dos anticorpos chagásicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Soros Chagásicos*

Soros de pacientes chagásicos, de forma crônica da infecção foram recebidos, em nitrogênio líquido, do Brasil Central, Venezuela, Argentina e El Salvador, para o preparo de um soro de referência para moléstia de Chagas (Almeida et al, 1972). Aliquotas de 62 soros foram mantidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  e usadas nesta investigação.

### *Antígeno de Trypanosoma cruzi*

O antígeno aquoso foi preparado de cultivos em meio difásico, da cepa BT de *T. cruzi*, segundo técnica descrita por Almeida & Fife (1976). A dose de antígeno empregada foi a de máxima reatividade para reações com 10 unidades de complemento.

### *Reação de Fixação de Complemento*

A reação de fixação de complemento foi praticada segundo duas técnicas, uma estática e outra cinética.

Pela técnica estática, determinam-se os títulos do soro como a inclinação da linha de regressão, tendo por abcissas as quantidades de soro necessárias para 50% de hemólise e por ordenadas as unidades de complemento empregadas (Almeida & Fife, 1976).

No método cinético mede-se a avidéz do complexo imune para o complemento, como a inclinação da linha de regressão tendo por abcissas os tempos de incubação e por ordenadas os logaritmos neperianos dos tempos necessários para 50% de hemólise.

Por essa técnica, a mistura de soro chagásico, antígeno de *Trypanosoma cruzi* e complemento é incubada a  $37^{\circ}\text{C}$ . De 20 em 20 minutos 1,6 ml da mistura é transferida para uma cubeta de 3 ml, adicionando-se 0,4 ml de hemácias sensibilizadas (Almeida & Fife, 1976). Mede-se então o tempo necessário para 50% de hemólise, correspondente a 35% de transmitância, em comprimento de onda de  $580\text{ m}\mu$  no espectrofotômetro ZEISS PQ-II, tendo sido aferido a 18% para o tubo sem hemólise.

### *Eletroforese*

A eletroforese dos soros chagásicos foi feita em papel Whatman n. 1, com tampão de veronal sódico, de pH 8,4, aplicando-se uma corrente de 1,4 miliamperes por 16 horas. A leitura das fitas foi feita em integrador ELPHOR, calculando-se os teores das várias frações séricas, a partir do teor de proteínas totais.

*Imunofluorescência*

O teste de imunofluorescência foi feito em soros, em diluições, determinando-se os seus títulos como o inverso da mais alta diluição que apresenta uma nítida fluorescência (Camargo, 1966).

*Hemaglutinação*

As mesmas diluições de soro preparadas para o teste de imunofluorescência foram empregadas no teste de hemaglutinação, com hemácias sensibilizadas e preservadas (Camargo et al, 1973).

Os títulos por hemaglutinação foram definidos como o inverso da maior diluição de soro mostrando uma nítida aglutinação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações produzidas pelo aquecimento do soro normal a 56°C por 30 minutos tinham sido mostradas por Lecomte du Nouy (1936), na sua viscosidade, estabilidade e sedimentação das globulinas, tensão interfacial, modificação do pH etc., além da inativação do complemento.

Para completar tais observações, 50 soros chagásicos foram submetidos à eletroforese, antes e depois de inativados. Os resultados estão apresentados na Tabela I.

Foi feita a comparação das diferentes frações proteicas dos soros chagásicos, numa amostragem pareada. Nessas condições é importante a co-variança entre os valores observados *antes* e *depois* do aquecimento. Estudou-se a regressão dos valores de "antes" sobre os de "depois", principalmente para o caso em que os coeficientes de regressão são  $\alpha = 0$  e  $\beta = 1$ , indicando a igualdade dos parâmetros das populações amostradas. Os níveis críticos para o teste F são de 4,04 para 5% e 7,19 para 1%. Projetando-se, em abscissas, os valores das frações do soro ativo e em ordenadas os teores das frações do soro inativado, linhas de regressão puderam ser traçadas e determinados os seus parâmetros pelo método dos quadrados mínimos.

Os valores de F para 48 graus de liberdade, apresentados na Tabela I, indicam marcada alteração na mobilidade das frações séricas pelo aquecimento a 56°C.

TABELA I

Comparação entre as frações proteicas determinadas antes e depois do aquecimento a 56°C por 30 minutos

<i>Fração sérica</i>	<i>Linha de regressão</i>	$F_1''$ para beta e 48 G.L.	$F_1'''$ para alfa e 48 G.L.
Albumina	$\hat{y}_i = 1,61 + 0,60x_i$	18,52	18,66
Alfa-1	$\hat{y}_i = 0,12 + 0,46x_i$	32,19	17,70
Alfa-2	$\hat{y}_i = 0,54 + 0,35x_i$	27,75	47,38
Beta	$\hat{y}_i = 0,28 + 0,74x_i$	4,25	8,17
Gama	$\hat{y}_i = 0,60 + 0,61x_i$	15,52	14,30

$\hat{y}_i$  valores calculados após a inativação

$x_i$  valores achados antes da inativação.

Na investigação do efeito da inativação sobre a reatividade com antígeno de *Trypanosoma cruzi* foram examinados 12 soros chagásicos, por fixação de complemento, imunofluorescência e hemaglutinação.

A determinação de seus índices de avidéz, em soro ativo e soro inativado, assim como os seus títulos por fixação de complemento, mostrou que a inativação reduz a reatividade do complexo imune para o complemento, como é exemplificado nas Tabelas II e III, Figs. 1 e 2.

TABELA II

Efeito da inativação sobre a avidéz do complexo imune chagásico para o complemento.

Soro n. 79605	Minutos de incubação a 37°C						Índice de avidéz
	20	40	60	80	100	120	
	Minutos necessários para hemólise de 50%						
Ativo	5,3	8,5	15,1	27,3			$275 \times 10^{-4}$
Inativo	2,78	3,0	3,1	3,2	3,33	3,52	$21 \times 10^{-4}$

TABELA III

Efeito da inativação sobre os títulos por fixação do complemento

Soro chagásico 79605	ml de soro para 50% de hemólise com			Título
	5	7,5	10. U.C	
Ativo	0,00250	0,00379	0,00498	1015
Inativo	0,00663	0,00982	0,01335	743

A Tabela II mostra o efeito do aquecimento sobre os índices de avidéz do soro chagásico 79605, com uma redução de 13 vezes, enquanto a Tabela III mostra os títulos do mesmo soro por fixação do complemento.

Na Tabela IV são apresentados não só os índices de avidéz e os títulos dos 12 soros chagásicos, antes e depois de aquecidos, como também a queda percentual dos índices (Y%) e as dos títulos (X%).

Existe uma perfeita correlação (índice de correlação de 0,9977) entre os valores de Y% e X% que se relacionam como:

$$Y = 41,534 + 0,8165 X$$

O ensaio feito, na realidade, mede a fixação do complemento, cineticamente, medindo seus índices de avidéz ou estaticamente determinando a relação entre imune-complexo, em termos de soro, e as quantidades (em unidades) de complemento empregadas.

As alterações do soro pelo aquecimento, além de inativar o complemento poderiam destruir parte de anticorpos, como admitiram Gradwohl (1917) e Kolmer et al

### REAÇÃO DE GUERREIRO - MACHADO

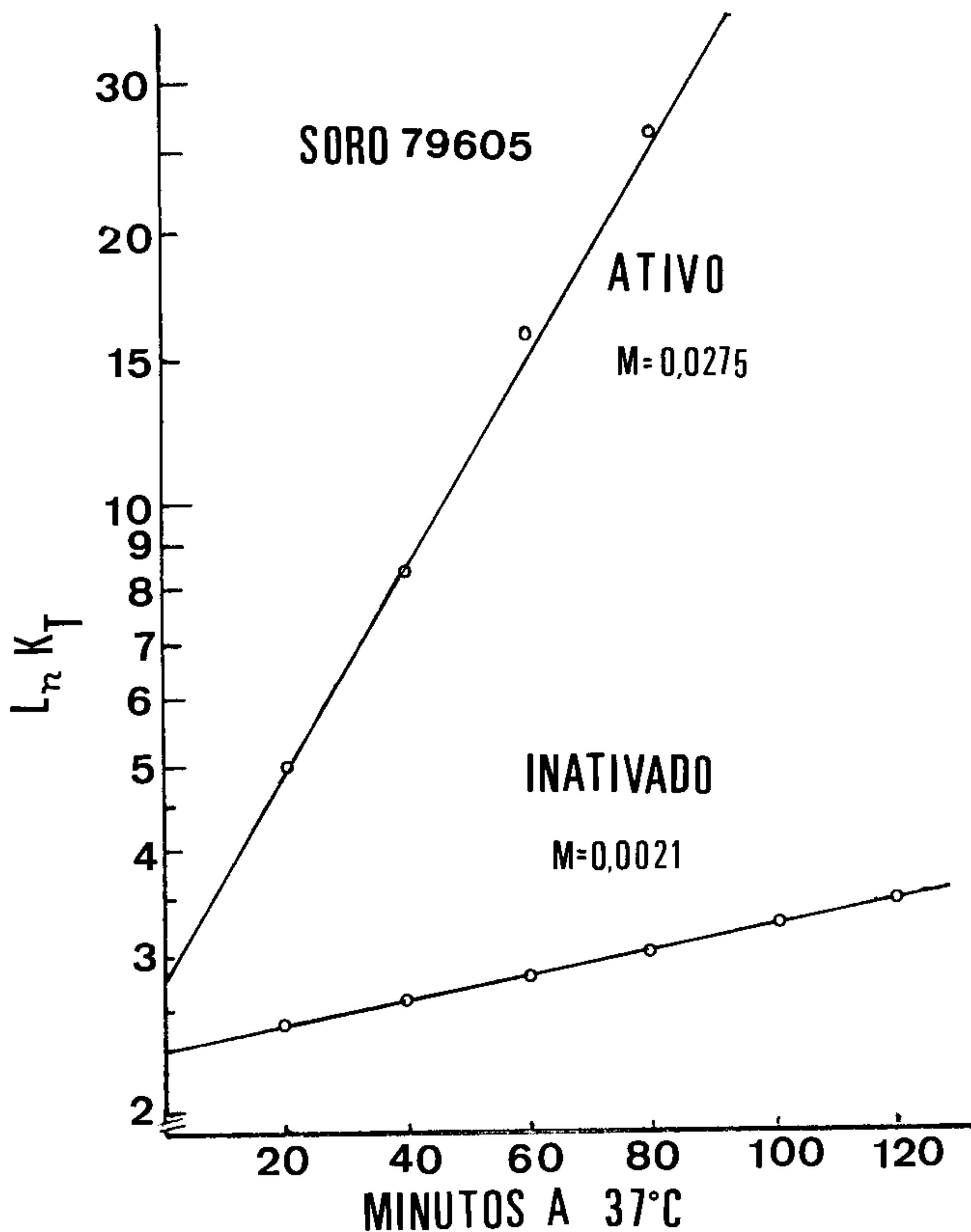


Fig. 1 – O índice de avides é definido como a inclinação da linha de regressão na qual os tempos de incubação estão nas abcissas e os logaritmos neperianos dos tempos necessários para 50% de hemólise, em ordenadas.



## REAÇÃO DE GUERREIRO-MACHADO

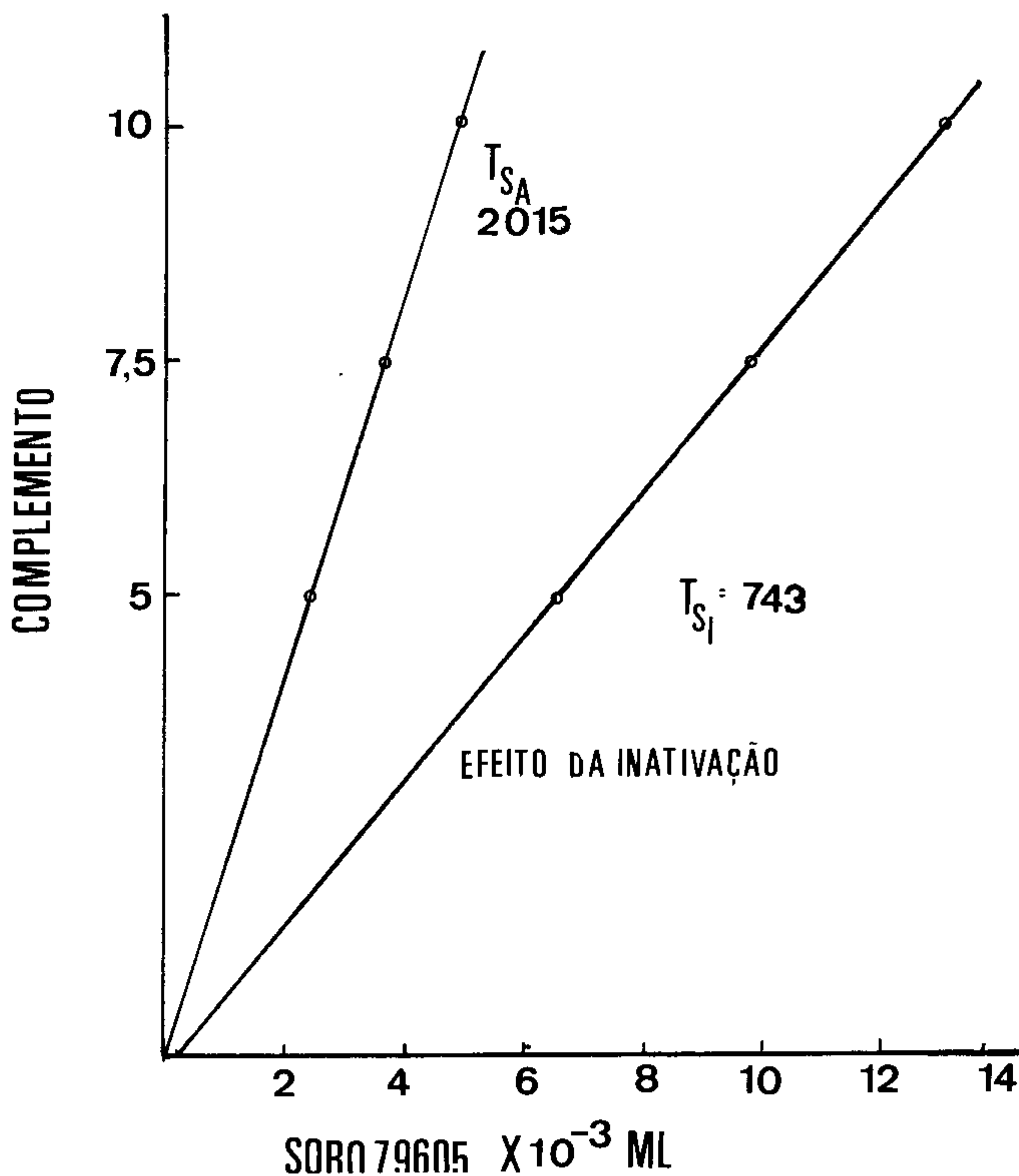


Fig. 2 – O título do soro é definido como a inclinação da linha de regressão em que as quantidades de imuno-complexo, em termos de soro, estão nas abcissas e as unidades de complemento, em ordenadas T<sub>SA</sub> = título com soro ativo T<sub>S<sub>I</sub></sub> = título com soro inativado.

(1920) para soros sífilíticos. Se tal destruição ocorresse os títulos dos soros chagásicos antes e depois de aquecidos, seriam diferentes quando determinados por técnicas que não envolvem complemento, tais como a imunofluorescência e hemaglutinação.

A hipótese da labilidade ao calor de anticorpos chagásicos não foi confirmada pelos resultados obtidos por técnica de imunofluorescência e hemaglutinação, e apresentados na Tabela V.

TABELA IV

Efeito da inativação do soro sobre o índice de avidéz e sobre os títulos por fixação de complemento

<i>Soro chagásico</i>	<i>Índices de avidéz</i>			<i>Títulos por Fix. C'</i>		
	<i>ativo</i>	<i>inativado</i>	<i>Y%</i>	<i>ativo</i>	<i>inativado</i>	<i>X%</i>
77893	0,0314	0,9194	61,9	2100	525	25,0
76846	0,0042	0,0027	65,2	1800	522	29,0
78312	0,0036	0,0024	66,8	750	232	31,0
79401	0,0168	0,0130	77,5	930	409	44,0
79536	0,0216	0,0178	82,4	2340	1170	50,0
77892	0,0034	0,0030	88,9	1930	1190	58,0
72642	0,0232	0,0219	94,7	460	299	65,0
79605	0,0275	0,0021	92,4	2011	742	63,1
79700	0,0038	0,0006	83,9	1230	590	52,0
79791	0,0084	0,0024	71,5	801	530	33,8
79320	0,0036	0,0013	64,0	1620	1166	28,0
78798	0,0162	0,0067	59,1	2500	1923	23,1

$$Y = 41,534 + 0,8165 X$$

$$r = 0,9977$$

TABELA V

Títulos por imunofluorescência e hemaglutinação de soros chagásicos antes e depois de inativados

<i>Soro chagásico</i>	<i>Imunofluorescência</i>		<i>Hemaglutinação</i>	
	<i>Ativo</i>	<i>Inativado</i>	<i>Ativo</i>	<i>Inativado</i>
77893	640	640	1280	1280
76846	640	640	2560	2560
78312	320	160	320	320
79401	320	320	640	640
79563	1280	1280	5120	5120
77892	640	640	2560	2560
72642	160	160	80	160
79605	640	320	160	160
79700	320	640	1280	1280
79791	160	160	160	320
79320	320	320	640	640
78798	640	640	2560	2560

Os títulos são definidos como o inverso de maior diluição que apresenta uma nítida reação.

## CONCLUSÕES

1. O aquecimento a 56°C por 30 minutos de soros chagásicos altera a mobilidade iônica das proteínas séricas, além de inativar o complemento.

2. A inativação do soro diminui a avidéz do complexo antígeno-anticorpo chagásico para o complemento, decrescendo também o título por fixação do complemento.

3. Existe uma estreita correlação entre a queda da avidéz e a queda do título, por efeito da inativação.

4. A diminuição da reatividade do complexo imune para complemento não se deve à labilidade térmica dos anticorpos chagásicos, que se mantém nos mesmos níveis, quando medidos por técnicas que não envolvem complemento.

## SUMMARY

The heating for 30 minutes at 56°C not only modifies the electrophoretic profiles of the Chagasic sera, but also their specific reactivity in complement-fixation with *Trypanosoma cruzi* antigens. The complement fixation titers are lower in inactivated sera and the avidity for complement of the immune-complex is reduced. It was found a correlation between the diminution of the CF titers and the reduction of the avidity for complement. The effects of inactivation on the specific reactivity of Chagasic sera was not observed with immunofluorescent antibody test or with hemagglutination. This finding does not support the hypothesis of thermolability of chagasic antibodies.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao prof. dr. Euclides Custódio de Lima Filho a análise matemática dos dados experimentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.O., 1963. The meaning of antibody titer in leprosy, determined by complement-fixation with antigens prepared from tubercle bacilli. An. VIII Congresso Internacional de Leprologia, pp. 263-275, Rio de Janeiro.
- ALMEIDA, J.O.; CERISOLA, J.; CEDILLOS, R. & MAEKELT, G.A., 1972. Soro de referência internacional para moléstia de Chagas. Soc. argent. Parasitol., Simpósio Internacional sobre enfermidade de Chagas, pp. 125-133, Buenos Aires.
- ALMEIDA, J.O. & FIFE, E.H., 1976, Quantitatively Standardized Complement-Fixation Methods for Critical Evaluation of Antigens Prepared from *Trypanosoma cruzi*. Scientific Publication 319. Pan American Health Organization, 86 pgs.
- ALMEIDA, J.O.; SARAIVA, L.G. & NUSSENZWEIG, V., 1953. Estudos sobre as reações quantitativas de fixação do complemento. Alteração de títulos em reações de fixação do complemento pela inativação e manutenção dos soros em geladeira, nos sistemas sífilis, doença de Chagas, tuberculose e lepra. *Rev. paulista med.*, 43 :446.
- CAMARGO, M.E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop., São Paulo*, 15 :81-86.



- CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. & SIQUEIRA, G.R.V., 1973. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 15 :81-86.
- FARIA, R., 1980. Reação de fixação do complemento para doença de Chagas com soro ativo: sua importância para bancos de sangue. *Rev. paulista med.*, 96 :33-36.
- GRADWOHL, R.B.H., 1917. Some remarks on the serological diagnosis of syphilis, with special reference to the Hetch-Gradwohl test. *Am. J. Syph.*, 1 :300-305.
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A., 1913. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Chagas, como elemento diagnóstico. *Brasil-méd.*, 27 :225-226.
- KOLMER, J.A.; RULE, A. & TRIST, M., 1920. Studies on the Standardization of the Wassermann reaction. XIII. The influence of the heating serum upon complement fixation in syphilis. *Am. J. Syph.*, 4 :641-674.
- LECOMTE DU NOUY, 1936. La temperature critique du sérúm. Hemann et Cic. Ed. Paris, 230 pgs.
- NUSSENZWEIG, V., 1953. *Reação de fixação do complemento com soro ativo para o diagnóstico da doença de Chagas*. Tese da Fac. Medicina de São Paulo.
- NUSSENZWEIG, V. & ALMEIDA, J.O., 1954. Reação de fixação do complemento para doença de Chagas, com soro ativo. *Rev. Paulista med.*, 44(1) :53.