

REPRODUTIBILIDADE E ESTABILIDADE DE ANTIGENOS PREPARADOS DE CULTURAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA REAÇÕES DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO.*

José Oliveira de Almeida** Irwing Kagan***
Therzinhinha A. Cunha****

Antígenos preparados de culturas de Trypanosoma cruzi foram experimentados com um sêro chagásico de referência, em reações quantitativas de fixação do complemento. Quatro deles foram liofilizados em pequenos volumes e mantidos em geladeira. Um outro foi mantido em estado líquido, com azida sódica e a 3-6°C.

Os títulos do complexo-imune, em termos de sêro ou de antígeno foram determinados como a inclinação da linha de regressão traçada quando se projetam as quantidades de complexo (em termos de sêro ou de antígeno) necessárias para 50% de hemólise contra o número de unidades de complemento usadas na reação.

Dividindo-se o título do antígeno pelo título do sêro, obtem-se um índice de reatividade específica (I.R.E.), que informa sobre a reprodutibilidade e estabilidade do antígeno. Examinando os antígenos, de frascos colhidos ao acaso, verificou-se que os antígenos B.W. 89 e CDC 10-75 apresentaram um I.R.E. com pequena diferença entre as amostras, enquanto maior variação foi observada com os antígenos B.W. 105 e 760130. Antígenos reconstituídos e mantidos em geladeira, até oito meses, perdiam lentamente sua capacidade reativa, com exceção do antígeno B.W. 89 e CDC 10-75.

*Os dados sugerem que o uso de antígenos de *T. cruzi* para reações de fixação do complemento devem ser empregados quando reconstituídos, evitando-se sua manutenção em estado líquido, pela queda do seu poder fixador.*

INTRODUÇÃO

Antígenos preparados de culturas de *Trypanosoma cruzi* para uso em reações de fixação de complemento, segundo o método de KELSER^{1,2}, embora específicos, eram instáveis já no fim de 4 semanas. Com a introdução do "merthiolate" por DAVIS⁸ foi possível se ter antígenos estáveis até um ano, mesmo provenientes de vários lotes de tripanosomas. MUNIZ e FREITAS^{1,4} confirmam a estabilidade do antígeno de DAVIS durante três meses. O antígeno de DAVIS, preparado segundo MUNIZ e FREITAS, apresentava queda do poder fixador, já no fim de um mês, mesmo quando conservado com "merthiolate" em geladeira, segundo FREITAS^{1,0}. Na observação de PELLEGRINO^{1,5} o antígeno de DAVIS poderia

ser usado até cinco meses depois de preparado, se mantido em geladeira.

A reprodutibilidade de antígenos pode ser constatada, quando eram eles preparados de tripanosomas secos, mantidos em vácuo e em baixa temperatura, segundo LIEM^{1,3}. FREITAS^{9,10} confirmou tais resultados, obtendo antígenos de igual potência tanto de tripanosomas colhidos recentemente como daqueles conservados secos.

Antígenos preparados pela técnica de FREITAS & ALMEIDA^{1,1} mantiveram inalterada capacidade fixadora até dezenove meses, quando conservados a 5°C ou a -30°C, segundo FREITAS^{1,0}.

A medida do poder de combinação entre sêro chagásico e antígenos de *T. cruzi* pôde ser feita determinando-se o índice de capaci-

*Trabalho realizado com auxílio (SIP 08-053) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**Professor catedrático do Dep. Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Un. São Paulo.

***Diretor da Divisão de Parasitologia Centro de Controle de Doenças, Atlanta, Georgia. Est. Unidos.

****Técnica em Imunologia. Fac. Medicina de Ribeirão Preto.

Recebido para publicação em 15.1.1978.

dade reativa específica, como um quociente entre título do antígeno e o título do soro (ALMEIDA ET AL.⁶).

No estudo da atividade fixadora de antígenos de *T. cruzi* as discrepâncias entre reações feitas com os mesmos elementos não foram maiores nem mais freqüentes do que as observadas no sistema sífilis, segundo ALMEIDA & SIQUEIRA⁷. Dessa forma se pôde comparar a reatividade específica de antígenos de *T. cruzi* em reações com soros chagásicos. Empregando o antígeno aquoso de FREITAS & ALMEIDA¹¹, SIQUEIRA¹⁶ observou queda do título do antígeno, já em 4 semanas, mantendo-se porém o índice de capacidade reativa específica. Os títulos de antígenos recentes foram maiores que os dos antígenos preparados com tripanosomas conservados secos.

Nesse trabalho, SIQUEIRA¹⁵ empregou a técnica de fixação de complemento quantitativa, baseada nas curvas isohemolíticas¹ determinadas com o antígeno benzeno-cloroformado. Antígenos preparados de um mesmo lote de tripanosomas secos, em dias diferentes de 16 e de 93 dias, foram aprovados nos testes de análise sequencial, para reatividade não específica, com soros não chagásicos e para reatividade específica, com soros de pacientes com doença de Chagas.¹⁶

No presente trabalho estudou-se a reprodutibilidade e a estabilidade de antígenos de *T. cruzi* preparados em Ribeirão Preto, em Atlanta e em Marburg, utilizando a técnica quantitativa^{3/5} de fixação do complemento.

Observou-se que os títulos do soro de referência⁴ variaram juntamente com os títulos dos antígenos, dentro de limites toleráveis para esse tipo de bio-ensaio.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos de *T. cruzi*

Os antígenos experimentados foram preparados de culturas de *Trypanosoma cruzi* por extração aquosa dos Tripanosomas previamente tratados pelo benzeno^{5/11}. Os antígenos foram distribuídos em frascos de vidro neutro, liofilizados e mantidos a 3° - 6° C. Foram reconstituídos com água destilada e mantidos em geladeira, nas provas de estabilidade. Os antígenos estudados foram os seguintes: B. W. 89, B. W. 105, CDC 10-75, 760130 e 760825. Este último foi mantido em forma líquida, preservado com azida sódica a 1/5000 e conservado em geladeira.

Soro de Referência

O soro de referência usado neste ensaio é a mistura de soros provenientes de pacientes chagásicos, do Brasil, El Salvador, Venezuela e Argentina, liofilizada em volumes de 2,5 a 5,0 ml e mantidos a -30° C.

Complemento

Foi empregado complemento de coabaia, liofilizado, e reconstituído com água destilada, sendo preservado por solução conservadora⁵.

Diluinte

O diluinte empregado foi a solução salina boratada a que se juntaram cálcio e magnésio⁵.

Sistema Hemolítico

Foi empregado o sistema hemolítico, com hemácias de carneiro e hemolisina preparada em coelhos. A concentração celular foi de 5% aferida fotometricamente, enquanto a hemolisina era empregada em dose de máxima sensibilização⁵.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A leitura dos graus de hemólise foi feita colorimetricamente nos sobrenadantes, sendo o volume ajustado por junção de solução salina.

O soro chagásico e o antígeno foram diluídos em série geométrica, de razão 0,75. Quando os logaritmos das quantidades de soro ou de antígeno eram projetados em ordenadas, contra os logitos de hemólise, linhas de regressão puderam ser traçadas, e assim determinadas as quantidades de soro ou de antígeno necessários para 50% de hemólise. Quando essas quantidades eram projetadas em abscissas contra as doses de complemento inicialmente presentes, determinavam-se pontos sobre uma reta, cuja inclinação era o *título* do soro ou do antígeno.^{3/5}

Como as curvas de isofixação do sistema moléstia de Chagas, com antígenos aquosos de *T. cruzi* pertencem ao tipo I^{6/16}, as dosagens de soro foram feitas em excesso de antígeno, e as de antígeno, em excesso de soro.

As quantidades de complexo imune, em termos de soro ou de antígeno necessárias para 50% de hemólise foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados⁵.

O tempo de fixação do complemento foi de 15 a 18 horas em geladeira a 3° -6° C, enquanto a hemólise se processava a 37° C por 30 minutos.

Um exemplo da metodologia usada é apresentado nas figuras 1 e 2.

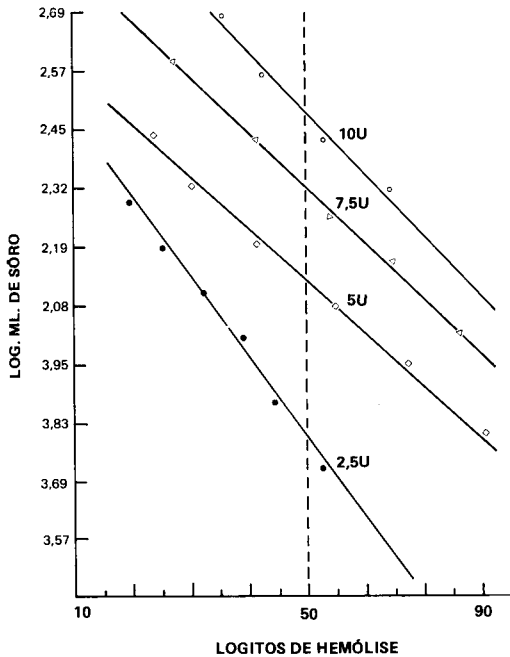


FIGURA 1. Os logaritmos das quantidades de soro chagásico projetados contra os logitos de hemólise, determinam pontos sobre uma reta, calculando-se então a quantidade de soro necessária para 50% de hemólise, para várias diluições de complemento.

DOSAGEM DO SORO DE REFERÊNCIA COM ANTÍGENO AQUOSO DE T. CRUZI

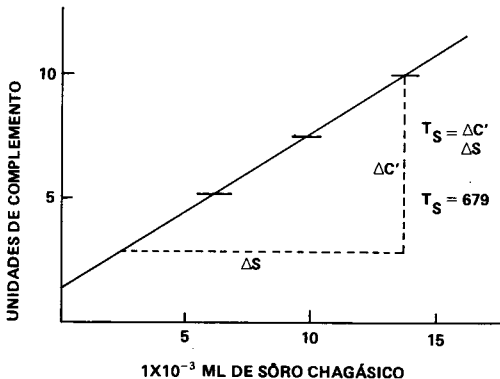


FIGURA 2. As quantidades de soro necessárias para 50% de hemólise, projetadas contra complemento (em unidades 50%) determinam pontos sobre uma reta, cuja inclinação é o título do soro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os antígenos CDC 10-75, B. W. 89, BW105 e 760130, liofilizados, foram reconstituídos e empregados em dose de máxima reatividade 1/20 nas dosagens do soro de referência chagásico.

Quando se processava a titulação do antígeno, o soro chagásico era usado na diluição de 1:2,5, para permitir que a reação fosse feita em excesso de anticorpos. Determinando-se os títulos do complexo imune, em termos de soro ou de antígeno, calcula-se o índice de reatividade específica, como o quociente entre título do antígeno e título do soro.

Os índices de reatividade determinados em frascos de um mesmo antígeno informam da estabilidade do antígeno liofilizado e mantido em geladeira TABELA I

TABELA I

CAPACIDADE REATIVA ESPECÍFICA DETERMINADA EM FRASCOS DE UM MESMO LOTE DE ANTÍGENO LIOFILIZADO

ANTÍGENO	FRASCO			MÉDIA
	1	2	3	
BW. 105	10,8	7,0	8,7	8,8
BW. 98''	12,2	11,1	16,4	13,2
CDC 10-75	6,6	8,6	7,9	7,7
760130	10,9	7,9	7,8	8,9

" Preparado há mais de dois anos.

Verificamos haver variações de reatividade em frascos diferentes, sendo que menor variação ocorreu com o antígeno W. B. 89 e com o antígeno CDC 10-75.

O antígeno reconstituído e mantido em geladeira mostra uma lenta queda dos seus índices, como mostra a TABELA 2. A observação foi feita depois de 4 e 8 meses. Os antígenos CDC 10-75 e B. W. 89 se mostram mais estáveis que os antígenos B. W. 105 e 760130.

As discrepâncias relativas entre os títulos do soro chagásico de referência (lote nº 13) determinados com os vários antígenos, mostram que os antígenos B. W. 89 e B. W. 105 são de igual reatividade, assim como os antígenos B. W. 105 e CDC 10-75, como mostra a TABELA 3.

CAPACIDADE REATIVA ESPECÍFICA DE ANTÍGENOS RECONSTITUÍDOS E MANTIDOS EM GELADEIRA ATÉ OITO MESES.

ANTÍGENO	TEMPO DE OBSERVAÇÃO EM MESES		
	0	4	8
B. W. 105	13,8	4,9	9,1
B. W. 89	16,8	10,2	12,7
CDC 10-75	6,6	5,1	4,9
760130	10,9	9,7	7,5

TABELA 3

DISCREPÂNCIAS RELATIVAS ENTRE TÍTULOS DO SORO DE REFERÊNCIA PARA MOLÉSTIA DE CHAGAS, DETERMINADOS COM VÁRIOS ANTÍGENOS

Antígenos comparados	Titulações realizadas em		
	Março 76	Outubro 76	Fevereiro 77
CDC/BW 89	19,3	25,3	9,8
CDC/BW	3,0	8,6	3,2
CDC/760130	69,9	70,7	33,7
BW 89/BW 105	16,3	16,7	6,6
BW 89/760130	86,0	47,5	24,1
BW 105/760130	15,8	63,0	30,6

Na comparação de antígenos admite-se uma discrepância relativa até de 16%, como devida à variabilidade dos métodos de medida da reatividade específica.

Quando são computados os títulos como a inclinação da linha de regressão no sistema de coordenadas, tendo por ordenadas as quantidades de complemento inicialmente presentes e em abscissas as quantidades de complexo imune, em termos de soro ou de antígeno, é possível o cálculo do índice de reatividade específica como o quociente entre o título do antígeno pelo título do soro. Nesse caso, tem-se que se ater à definição do índice, cujo cálculo já não envolve diretamente o complemento, a saber:

$$C. R. Específica = \frac{T_A}{T_S}$$

$$T_A = \frac{\Delta C}{\Delta A} \quad e \quad T_S = \frac{\Delta C}{\Delta S}$$

Então, substituindo:

$$C. R. Específica = \frac{\Delta S}{\Delta A}$$

Os dados apresentados na TABELA 4 sugerem as seguintes conclusões:

1^o O antígeno B. W. 89 manteve sua reatividade específica por 16 meses, comparando-se ao antígeno CDC 10-75.

2^o Foi observada uma queda lenta nos valores de I. R. E., mais pronunciada no antígeno 760835.

3^o A liofilização dos antígenos não impediu que sua reatividade específica, em relação ao soro chagásico de referência, diminuisse, sendo ela comparável à observada com o antígeno aquoso, mantido com azida sódica, em temperatura de 3-6°C.

TABELA 4

TÍTULOS DOS ANTÍGENOS E DO SORO DE REFERÊNCIA PARA MOLÉSTIA DE CHAGAS E SEUS ÍNDICES DE REATIVIDADE ESPECÍFICA.

ANTÍGENO	DATA	D.M.R.	T _A	T _S	I.R.E.
B.W.89	3/76	1:40	15115	1123	13,5
	3/76	1:20	15625	926	16,8
	10/76	1:20	10964	901	12,2
	2/77	1:20	7134	643	11,1
	7/77	1:20	11488	698	16,4
B.W.105	3/76	1:20	11904	862	13,8
	10/76	1:20	8256	761	10,8
	2/77	1:20	4201	602	6,9
	7/77	1:20	5096	588	8,7
	760130	3/76	1:160	14482	448
10/76		1:40	12500	1087	11,5
2/77		1:40	12750	819	15,6
7/77		1:20	15605	1990	7,8
CDC 10-75		3/76	1:40	9940	925
	10/76	1:20	4606	699	6,6
	2/77	1:20	2222	282	7,9
	12/77	1:20	3796	426	8,9
	760825''	8/76	1:20	15630	625
10/76		1:20	11280	422	26,7
2/77		1:20	15625	826	18,9
7/77		1:20	8200	540	15,2
12/77		1:20	7130	640	11,1

D.M.R. Dose de máxima reatividade. T_A = título do antígeno.

T_S = título do soro. I.R.E. Índice de reatividade específica.

('') Antígeno aquoso conservado com azida sódica e a 3-6°C.

SUMMARY

Antigens prepared from cultures of Trypanosoma cruzi were tested by the quantitative complement fixation test, with a Chagasic reference serum. The titer was computed as the slope of the linear relationship between antigen (or serum) required for 50% hemolysis

and the amount of complement present. When the antigen titer was divided by the serum titer, an index of specific reactivity was obtained. From the values of this index the reproductibility of antigens was evaluated and also the decay of the capacity of the reactivity against the reference serum. It was observed some variations from different vials and some decay of the specific reactivity after 8 months, when kept at 3-6° C.

From five antigens prepared by similar technics, two presented comparable reactivity (CDC-10-75 and B.W. 89). The relative discrepancies of specific reactivity were within acceptable limits with the antigens B.W. 89 and B.W. 105, in titrations performed at different time. The highest discrepancy was observed when the antigen 760130 was compared with CDC-10 75, B.W. 89 and B.W. 105.

The index of reactivity capacity permitted the evaluation of antigens prepared from *T. cruzi*, informing on their reproductibility and stability.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.O., On the use of von Krogh's method for standardization of quantitative complement-fixation tests. *J. Immunol.*, 76:259 - 263, 1956.
- ALMEIDA, J. O., On the use of von Krogh's logistic equation in the quantitative complement fixation test. *Rev. Microbiologia*, 2:191 - 197, 1971.
- ALMEIDA, J. O., Standardized Quantitative Complement-Fixation test. In Research in Immunochemistry and Immunobiology. Volume 2:248 - 292, 1972.
- ALMEIDA, J. O.; CERISOLA, J.; CEDILLOS, R. & MAEKELT, G. A., Soro de referência internacional para moléstia de Chagas. Simpósio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Sociedade Argentina de Parasitología, Buenos Aires, pgs. 125-133, 1972.
- ALMEIDA, J. O. & FIFE, E. H. Jr., Quantitatively Standardized Complement-Fixation Methods for Critical Evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. Scientific Publication n° 319. Panamerican Health Organization, 1976.
- ALMEIDA, J. O.; FREITAS, J. L. P. & SIQUEIRA, A. F., Capacidade reativa específica do antígeno com anticorpo em reações de fixação do complemento para moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1:266-272, 1959.
- ALMEIDA, J. O. & SIQUEIRA, A. F., Estudo da discrepância relativa entre pares de reações simultâneas de fixação de complemento no sistema moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 2:204-212, 1960.
- DAVIS, D. J., An improved antigen for complement fixation in American trypanosomiasis. *Public Health Rep.* 58:775-777, 1943.
- FREITAS, J. L. P., Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. Tese da Faculdade de Medicina de São Paulo, 160 pgs. 1947.
- FREITAS, J. L. P., Observações sobre a estabilidade de antígenos de culturas de *Trypanosoma cruzi* para reações de fixação do complemento. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 38:513-519, 1950.
- FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O., Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 35:787-800, 1949.
- KELSER, R. A., A complement-fixation test for Chagas' disease employing an artificial culture antigen. *Am. J. Trop. Med.*, 16:405-416, 1936.
- LIEM, S. D., Onderzoekingen over *Triatoma infestans* als overbrenger van alkele pathogene organismen en over de complement-bindingreactie by de ziekte van Chagas. *Trop. Dis. Bull.*, 35:719-720, 1938.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G., Contribuição para o estudo da doença de Chagas pelas reações de imunidade. *Men. Inst. Osw. Cruz*, 41:303-333, 1944.
- PELLEGRINO, J. & BORROTCHIN, M., Inquérito sobre a doença de Chagas no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). *Men. Inst. Osw. Cruz*, 46:419-457, 1948.
- SIQUEIRA, A. F., Comparação de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para reações quantitativas de fixação do complemento. I. Linearidade entre complexo imune e complemento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6:101-110, 1964.
II. Análise sequencial de probabilidade direta aplicada ao sistema moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6:268-276, 1964.