

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 37

Ano — 1942

Fascículo 1

Reação de fixação do complemento na Doença de Chagas, com antígeno alcoólico de cultura do “*Schizotrypanum cruzi*” *

por

Cecilio Romãna e Emmanuel Dias

A aplicação da reação de Bordet-Gengou ao diagnóstico da doença de Chagas tem sido praticada por diversos autores com resultados às vezes satisfatórios, porém nem sempre concordantes, devido principalmente ao fato de não trabalharem com antígenos que, além de possuírem as qualidades indispensáveis a esses reativos, fossem suficientemente estáveis e rigorosamente padronizáveis.

Na presente nota descrevemos o preparo de um antígeno alcoólico dotado destas qualidades, feito com culturas do *Schizotrypanum cruzi*, e relatamos os resultados das primeiras reações com ele ensaiadas.

Inicialmente, passaremos em revista os diferentes antígenos que até agora têm sido utilizados na reação.

Guerreiro & Machado (1913), os primeiros a estudar a questão, experimentaram três antígenos. Um deles era feito com tripanosomas do sangue de animal infectado, separados por centrifugação, lavados e emulsionados

* Recebido para publicação a 31 de dezembro de 1941 e dado à publicidade em abril de 1942.

Trabalho do Serviço de Estudo das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz (Manguinhos) — Superintendente interino: Professor Carlos Chagas Filho.

em soro fisiológico. Como oferecesse dificuldade a obtenção de grande quantidade de parasitos do sangue, resolveram utilizar-se do baço de cães jovens infectados, com o qual prepararam antígenos aquosos e antígenos glicerina-dos, sendo estes tratados previamente pelo álcool e suspenso o depósito disse-cado em água fisiológica. Destes três reativos, o que melhores resultados proporcionou foi o antígeno aquoso de baço.

Cunha & Villela (1919) trabalharam com extratos aquosos de órgãos de animais infectados (coração, baço e cérebro de cão, coração de cobaia), obtendo bons resultados com alguns e relacionando a atividade do antígeno com a riqueza, em parasitos, do órgão empregado. Observaram estrita espe-cificidade dos extratos ativos, mas comprovaram a sua labilidade, expressa pela rápida queda do poder fixador e aumento do poder impediante.

Leão (citado por Villela & Bicalho, 1923) trabalhou com coração e baço de cães doentes, preparando extratos alcoólicos, que não julgou utilizáveis, e extratos aquosos, cuja instabilidade também verificou. Sugeriu, para afastar este inconveniente, o preparo de antígeno aquoso no momento do uso, com baço dissecado, pulverizado e guardado em baixa temperatura.

Assinalando as desvantagens dos extratos aquosos de órgãos, Villela & Bicalho (1923) propuseram o preparo de antígenos glicerina-dos mistos, de baço e coração de cães infectados, assim constituídos: polpa de órgãos, 1 parte, água destilada, 2 partes, glicerina 1 parte, fenol 0,5%. Obtiveram "óti-mos resultados" nas reações, mostrando-se o antígeno utilizável até pelo menos 4 meses depois de preparado.

Lacorte (1926) conseguiu melhores resultados com antígenos gliceri-nados de baço de cão novo infectado, do que com antígenos glicerina-dos de baço e coração. Não obteve a mesma durabilidade que Villela & Bicalho con-seguiram, aparecendo regularmente a ação impediante entre 15 e 30 dias.

Ortiz Patto (1930) fez ensaios no bócio endêmico com antígenos glice-rina-dos feitos com órgãos infectados e com antígenos metílicos (órgão fresco moido, 1 parte, álcool metílico, 2 partes; maceração na estufa, 5 dias; dilui-ção 1/3 e 1/5 em água fisiológica), sendo estes "bastante estáveis e despro-vidos de ações proteotrópicas e hemolíticas".

Trabalhando com o antígeno de Watson (*Trypanosoma equiperdum*), Julio Muniz (1930) obteve vários resultados positivos em casos comprovados ou suspeitos de doença de Chagas, bem como em casos de leishmaniose cutâ-nea, e resultados negativos em sífilíticos com Wassermann fortemente posi-tivo. O antígeno é, porém, de preparo trabalhoso e só é utilizável no mesmo

dia ou no máximo no dia seguinte ao de sua confecção. Ensaçando antígenos constituídos por emulsão de culturas ricas de *S. cruzi* em meio N.N.N. e em Noguchi, verificou-os desprovidos de qualquer ação fixadora.

Minning (1935) empregou na reação extratos glicerinados de órgãos de cães infectados com amostra brasileira de *S. cruzi*, preparados segundo a técnica de Villela & Bicalho (1923). Os extratos de baço revelaram maior poder fixador do que os de músculo, coração e fígado. Com os antígenos de baço, este autor obteve resultados positivos com muitos soros de pacientes sofrendo das mais diversas doenças ou condições, como sífilis, anemia perniciosa, hipotireoidismo, verminose, gravidez, período *post-partum*, bem como com soros de animais infectados com *Trypanosoma gambiense* e *Treponema pallidum* — daí concluindo pela inteira inespecificidade da reação de Guerreiro-Machado. Entretanto, diversas restrições podem ser postas quanto às condições em que foi dado a Minning trabalhar, as quais impedem a aceitação imediata de sua conclusão.

No esquema da reação principal utilizado por Minning (quadro 2, p. 318), não figura um indispensável tubo testemunha do poder impediante do soro em presença da menor dose de complemento empregada (0,8cm³ da diluição a 1/15). Conquanto refira que o poder fixador de seus antígenos não diminuiu em 5 meses de observação, Minning nada refere quanto a possíveis variações do poder impediante, no decorrer deste tempo; nos 17 antígenos com que trabalhou, Lacorte (1926) verificou sempre o aparecimento de impediência 15 a 30 dias depois da preparação. Os únicos soros de que Minning dispunha para controle da atividade fixadora específica de seus extratos eram apenas os de 4 cães infectados com *S. cruzi*. Ora, tanto Cunha & Villela (1919), como Villela & Bicalho (1923), já tinham insistido em que o soro deste animal é dificilmente utilizável na reação, pela frequência com que se torna impediante, sendo que “no pequeno número de reações aproveitáveis o resultado não foi concludente” (Villela & Bicalho 1923, pág. 24). Os próprios resultados das reações de Minning com soro de seus cães foram irregulares, mostrando oscilações “rítmicas” atribuídas às variações do poder impediante dos soros.

É de toda importância salientar que nem todos os antígenos preparados com baço de cão infectado são empregáveis na reação, dependendo o seu uso de ensaios preliminares para controle de sua especificidade. Segundo Villela & Bicalho (1923), “às vezes o antígeno no momento da reação se mostra de pouco valor”. Lacorte (1926) refere que um de seus antígenos, recentemente preparado e experimentado com cerca de 20 soros, deu resultados inteiramente

inespecíficos, sem que fosse isto devido ao seu poder impediante, previamente dosado. Antes de aplicar a reação a doentes dos arredores de Belo Horizonte, Villela (1930) submeteu o antígeno a uma série de provas cujo resultado lhe permitiu confiar nos resultados mais tarde conseguidos. Como bem diz Muniz (1930, pág. 897): "sucede que ese antígeno no siempre funciona con regularidad y fijeza, segun la opinión de Lacorte, quien aconseja el maximo cuidado en su uso, y solamente considerarlo utilizable después de submeterlo a dosajes rigurosos y ensaios con testigos, tanto de pacientes de otras enfermedades como de individuos normales, a fin de evitar fijación sin especificidad alguna".

Por fim, não obstante asseverar Minning (p. 318) que extratos de órgãos de cão normal nenhum poder fixador tenham mostrado, em outro lugar (pág. 326) consigna resultados positivos obtidos com tais extratos, em presença de soros de anemia perniciosa e outros que deram reação positiva também com extratos de órgãos de cão infectado.

Com o seu trabalho, Minning não demonstrou que a reação de Guerreiro-Machado é inteiramente inespecífica, mas apenas que os antígenos que empregou nenhuma especificidade possuíam. Estamos em pleno acordo com Yorke (1937, pág. 295), quando conclue sobre o valor desta reação: "Whilst the evidence is probably as yet insufficient to warrant a definite opinion regarding the significance of the Machado reaction, sufficient work seems to have been done to indicate that it cannot be brushed aside as unworthy of serious investigation".

Procurando obter um melhor antígeno para a reação, Kelsner (1936), preparou emulsões hidro-glicerinadas de culturas recentes de *S. cruzi* em meio de Bonacci, com as quais conseguiu resultados bastante bons. Entretanto, tem ainda estes antígenos a desvantagem de serem instáveis, pois se tornam rapidamente impediotes (tempo máximo de utilização, 1 mês).

Em vista dos inconvenientes oferecidos pelos antígenos anteriormente usados na reação de fixação do complemento na doença de Chagas, decidimos ensaiar o uso de antígenos alcoólicos de cultura de *S. cruzi*, encorajados pelos resultados favoráveis obtidos por Cunha & Dias (1938-1939) nas leishmanioses, com antígenos alcoólicos de cultura de *Leishmania*. Estes autores (ined.) tentaram preparar segundo a mesma técnica antígenos alcoólicos de *S. cruzi*, porém não obtiveram culturas em placa suficientemente ricas. Usamos porisso culturas em meio líquido, se bem que do ponto de vista da pureza do material básico do antígeno elas sejam inferiores às culturas em placa, sobre meio sólido.

CULTURA DO *S. CRUZI* PARA PREPARO DO ANTÍGENO

Empregamos a princípio o meio de Bonacci, seguindo o processo usado por Kelsner (1936) no preparo de seu antígeno. Neste meio conseguem-se culturas muito abundantes, mas ao serem colhidos os flagelados retira-se quase sempre uma certa quantidade de agar-sangue que é depois difícil de se separar por centrifugação. Este inconveniente, que também é apresentado por outros meios sólidos, torna-se mais acentuado quando se empregam maiores recipientes para obtenção das culturas. Usamos também um meio líquido composto de caldo glicosado e sangue de coelho hemolisado por água destilada; o *S. cruzi* nele vegeta bem, porém as culturas são mais pobres e duram menos do que as em meios sólidos ou semi-sólidos.

Partindo de meios conhecidos como favoráveis ao desenvolvimento do *S. cruzi*, adotamos uniformemente o seguinte método, que proporciona culturas suficientemente ricas, com a vantagem de poderem ser empregadas no preparo do antígeno quase livres de partículas do meio.

As culturas são feitas em frascos de Roux, a cujo gargalo é adaptado um tubo de 1 centímetro de diâmetro aproximadamente, para diminuir os riscos de contaminação durante a manipulação. No interior do frasco colocam-se 100 cm³ de gelose (agar 20 gr., peptona 10 gr., extrato de carne, 5 gr, cloreto de sódio 6 gr, água 1000 cm³); após esterilização, deixa-se esfriar a 50-55°, junta-se 10% de sangue desfibrinado de coelho ou de carneiro, agita-se e deixa-se solidificar o meio sobre uma das faces da garrafa. Cobre-se então sua superfície com 100 cm³ de caldo nutritivo da seguinte composição : água 1000 cm³, extrato de carne (Swiff) 3 gr. peptona 20 gr, glicose 30 gr, cloreto de sódio 6 gr, (pH 7,0-7,2). O caldo é esterilizado e conservado em aparelhos de distribuição com a capacidade de 3 ou 5 litros, o que facilita a sua repartição nos frascos de Roux. Estes devem ser semeados com boa quantidade de semente (10 cm³) e conservados a 20-25° C; ao cabo de 15 a 20 dias, as culturas estão em condições de ser utilizadas.

PREPARO DO ANTÍGENO

Recolhe-se a porção líquida das culturas, centrifuga-se e lava-se três vezes o depósito com soro fisiológico. Esgota-se o soro quanto possível, junta-se acetona pura num volume 10 vezes maior que o do depósito e agita-se repetidamente durante 24 horas. Após centrifugação, pipeta-se a acetona e deixa-se o depósito secar na estufa a 37° (pode conservar-se o material dissecado, para só ser usado no preparo final quando se tenha o bastante para a obtenção de quantidade apreciável do reativo). A massa obtida

é então pesada, triturada finamente e acrescentada de álcool absoluto na proporção de 1 cm³ para cada centigrama de pó. Após permanência na estufa a 37° durante 20 dias, em vidro bem fechado, que deve ser agitado frequentemente, está terminado o preparo do antígeno alcoólico bruto.

Os antígenos que usamos eram mistos, constituídos por amostras de *Schizotrypanum* isoladas de homem, gambá e morcego (*Hemiderma perspicillatum*).

EMPREGO — O antígeno foi geralmente empregado, no seu estudo preliminar e nas reações, em diluições feitas na hora, retirando-se com pipeta o álcool sobrenadante e diluindo-se gota a gota em soro fisiológico, sob constante agitação. O líquido toma um aspecto ligeiramente opalescente. Estudadas pelos métodos usuais as suas propriedades (poder impediante, hemolítico e fixador), foi usado nas reações em dose nunca superior à metade da dose mínima impediante, em diluições a 1/10 ou inferiores. O quadro 1 mostra uma das séries de ensaio do poder fixador do antígeno (n. 7, preparado em 7-7-41 e ensaiado em 14-11-41) em presença de diversos soros e de 2 unidades de complemento.

QUADRO 1

TUBOS	1	2	3	4	5
Soro inativado	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antígeno a 1/6.....	0,05	0,1	0,15	0,2	—
Compl. cobaia 1/10 (2 unidades).....	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Soro fisiológico.....	1,15	1,1	1,05	1,0	1,2
(após 1 hora a 37°, 2 cm ³ de sistema hemolítico dosado)					
Soro, 103 mol. chagas.....	++—	++++	++++	++++	—
Soro 105, mol. Chagas.....	++—	++++	++++	++++	—
Soro 150, leishmaniose tegumentar.....	—	+—	++—	++++	—
Soro 133, normal.....	—	—	—	—	—

A reação principal foi feita segundo o esquema do Quadro 2.

QUADRO 2

TUBOS	1	2	3
Soro.....	0,2	0,2	0,2
Antígeno.....	0,2	0,2	—
Compl. cobaia 1/10.....	1 u.	2 u.	1 u.

Soro fisiol. q s. para 2 cm³. Banho-maria 1 hora; sistema hemolítico 2 cm³; banho-maria 1 hora, leitura. Leitura definitiva 12-18 horas após permanência na geladeira.

Os resultados até agora obtidos, das reações praticadas com 83 soros humanos, estão relacionados no Quadro 3. Algumas dessas reações foram

feitas pelos Drs. A. Martins, V. Versiani e J. N. Peres, de B. Horizonte, utilizando o mesmo antígeno por nos fornecido (usando 0,1 e 0,2 cm³ de soro e duas unidades de complemento), tendo sido os resultados concordantes com os nossos.

QUADRO 3
RESULTADOS DAS REAÇÕES FEITAS COM 83 SOROS HUMANOS

DIAGNÓSTICO CLÍNICO	OBSERVAÇÕES	N. DE SOROS	R. DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO	
			Antig. alc. S. cruzi	Wassermann
Doença de Chagas	<i>S. cruzi</i> ao ex. direto	6	+	—
	Xenod. posit.	19	+	—
	1	+	+
	1	—	—
Doença de Chagas ?	Miocardite crônica	6 3	+	—
	Mal engasgo	1	+	—
	Bocio	2	—	—
Sífilis		5	—	+
Leishmaniose tegumentar	<i>L. brasiliensis</i>	7	+	—
		2	+	+
		1	—	+
		1	—	—
Malária	<i>P. vivax</i>	5	—	—
		2	—	(0)
Bouba	<i>T. pertenue</i>	2	—	+
		1	+	+
		1	—	—
Ancilostomose	<i>N. americanus</i>	1	—	—
Tuberculose		1	—	—
Psoríasis		1	—	—
Soros normais		14	—	—

Resultados das reações feitas com 83 soros humanos.

O Quadro 3 mostra que, de 27 casos autênticos de doença de Chagas, a reação foi positiva em 26 (96,3%), coincidindo uma única vez com a R. W. positiva. Um caso com xenodiagnóstico positivo deu reação negativa; o xenodiagnóstico foi repetido depois no paciente, duas vezes, resultando negativo. De 12 casos possíveis de doença de Chagas, residentes em zona de barbeiro, a reação foi positiva em 7, dos quais 2 morreram subitamente, (1) fato que ocorre com frequência na forma cardíaca da tripanossomose. Em 5 soros sífilíticos com R. W. fortemente positiva a reação foi negativa. As

(1) — Casos de Goiaz. Vide Romeiro, 1941.

duas reações foram feitas concomitantemente em 81 soros: apenas em 4 (2 de leishmaniose, 1 de boubá e 1 de doença de Chagas) ambas foram positivas; em 30 ambas foram negativas; em 39 a R. W. foi negativa e a reação foi positiva; em 8 a R. W. foi positiva e a reação foi negativa. Onze soros de leishmaniose tegumentar foram experimentados, sendo a reação positiva em 9, dos quais 2 com R. W. positiva. Em um caso de boubá de Teófilo Otoni (Minas Gerais), cidade onde tem sido encontrados casos de tripanosomose procedentes de zonas de *barbeiro* (Ferreira Lopes, 1941) a reação foi fracamente positiva (R. W. fortemente positiva), tendo sido negativa em 3 outros casos de dita moléstia. A reação foi negativa em 14 soros normais, 7 de malária, 1 de tuberculose, 1 de ancilostomose e 1 de psoríase, de indivíduos vivendo longe das zonas de tripanosomose endêmica.

Os resultados positivos conseguidos na quase totalidade dos casos certos de esquistripanose, e os resultados negativos obtidos com soros normais, de sífilíticos e de outras doenças, demonstram uma especificidade apreciável do antígeno e tendem a mostrar o valor da reação como método auxiliar para o diagnóstico da doença de Chagas. O antígeno não é, porém, dotado de estrita especificidade, porquanto resultados positivos foram verificados em casos de leishmaniose tegumentar (81,8%), o que torna a reação uma reação de grupo, explicável pelas afinidades biológicas dos protozoários causadores da doença de Chagas e das leishmanioses. Num único caso de boubá com reação fracamente positiva, não pôde ser verificada a possibilidade de tratar-se de um indivíduo portador também do *S. cruzi*.

O número de soros que nos foi dado experimentar ainda é sem dúvida pequeno para permitir conclusões definitivas sobre o valor real da reação, porém os resultados já obtidos são favoráveis, e justificam a recomendação do emprego do antígeno alcoólico de cultura do *S. cruzi* na reação de fixação do complemento na doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

Expressamos o nosso agradecimento aos Drs. A. Martins, V. Versiani, A. Tupinambá e J. N. Peres, de Belo Horizonte, pela sua valiosa cooperação para este trabalho, especialmente no que respeita ao controle dos nossos resultados; e aos Drs. Cid Ferreira Lopes, de Teófilo Otoni, D. S. Romeiro, de Pires do Rio, Goiaz e C. Drolle da Costa, da Santa Casa do Rio de Janeiro, pela boa vontade com que nos proporcionaram soros de doentes das respectivas clínicas.

SUMÁRIO

Os autores passam em revista os diferentes antígenos até agora empregados na reação de fixação do complemento na moléstia de Chagas. Pro-

põem o uso de um antígeno alcoólico feito com culturas de *S. cruzi*, assim preparado: lavam três vezes os flagelados das culturas com soro fisiológico; juntam acetona pura (10 vezes o volume do depósito) e deixam 24 horas agitando frequentemente; centrifugam, desprezam o líquido e secam o depósito a 37°; pesam, trituram e juntam álcool absoluto na quantidade 1 cm³ por cada centígrama; conservam a 37° durante 20 dias, agitando diariamente; para uso, diluem o álcool límpido na água fisiológica aos poucos e sob constante agitação.

A reação foi praticada com 83 soros humanos, sendo positiva em 96,3% dos casos de doença de Chagas e em 81,8% dos casos de leishmaniose tegumentar, doença cujo agente etiológico tem estreitas afinidades com *S. cruzi*.

Em 81 soros a reação foi feita paralelamente com a R. W., obtendo-se apenas 4 vezes a positividade de ambos os testes.

Os primeiros resultados das reações feitas com este antígeno podem ser considerados bastante favoráveis, sendo entretanto necessária uma maior experiência para se ajuizar do valor real da reação no diagnóstico da moléstia de Chagas.

APÊNDICE

Antes da impressão do presente trabalho foram feitas mais 20 reações com cada um dos antígenos, com os seguintes resultados :

<i>Diagnóstico clínico</i>	<i>N.º de soros</i>	<i>R. antígeno cruzi</i>	<i>R.W.</i>
Doença de Chagas (xenodiagnóstico positivo)	1	+	—
Doença de Chagas (doentes de Lassance com arritmias)	6	+	—
Idem	1	duvidoso	—
Epilepsia	4	—	—
Epilepsia (caso de Lassance)	1	+	+
Bócio	1	—	—
Méga-esôfago	1	—	—
Tabes	1	duvidoso	+
Encéfalopatia infantil	1	duvidoso	—
Soros normais	3	—	—

Agradecemos ao Dr. Antonio Couceiro a remessa dos soros com que trabalhamos.

BIBLIOGRAFIA

- Cunha, A. M. & Dias, E. — 1938
C. R. Soc. Biol., 129:991
- Cunha, A. M. & Dias, E. — 1939
Brasil Méd., 53:89
- Cunha, A. M. & Villela, E. — 1919
Citados por Villela & Bicalho, 1923
- Ferreira Lopes, C. — 1941
Minas Médica 8 (47): 244 — 258.
- Guerreiro, C. & Machado, A. — 1913
Brasil Méd., n. 23:225.
- Kelser, R. A. — 1936
Am. Jl. Trop. Med., 16:405
- Lacorte, J. G. — 1927
Memórias Inst. Oswaldo Cruz, 20:197
- Minning, W. — 1935
Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. 39:315
- Muniz, J. — 1930
5ª Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. N., 2:897
- Patto, O. — 1930
An. Fac. Med. Minas Gerais
- Romeiro, O. S. — 1941
O Hospital 20 (4): 587 — 590
- Villela, E. — 1930
An. Fac. Med. Minas Gerais, 2 (1): 1 — 18
- Villela, E. & Bicalho, C. — 1923
Memórias Inst. Oswaldo Cruz, 26:13-29