

EMPREGO DO ANTÍGENO TRÍPLICE, EM FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO EM PLACA PARA EXCLUSÃO SOROLÓGICA DA MOLÉSTIA DE CHAGAS, SÍFILIS E BRUCELOSE.

Therezinha Aparecida Cunha*

O método de fixação de complemento em gotas, sobre placas de plástico, usando antígeno misto de cardiolipina, suspensão de brucelas e extrato de T. cruzi, foi utilizado no exame de 112.365 soros provenientes de bancos de sangue e do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Os 18.279 soros que reagiram com o antígeno tríplice foram re-examinados com cada um dos antígenos, verificando-se que 77% a 88% deles eram chagásicos, de 8% a 23% eram sífilíticos e que 1% a 3% reagiam com o antígeno de brucelas.

Pela sua simplicidade, economia de tempo e de material, a técnica de fixação de complemento, com antígeno tríplice, se recomenda para a rotina dos bancos de sangue, hospitais e laboratórios de saúde pública, quando número elevado de sangue deve ser examinado.

INTRODUÇÃO

O uso de antígenos mistos em fixação de complemento para exclusão dos doadores chagásicos, sífilíticos, tuberculosos ou leprosos, foi recomendado por Almeida e cols¹ que verificaram a independência das reações antígeno-anticorpo nesses sistemas.

O emprego da técnica de Fulton & Dumbell⁹ adaptada à soro-diagnose da moléstia de Chagas³ poderia justificar o uso de um antígeno misto, por seus resultados serem comparáveis com os obtidos por método quantitativo em tubos, quer empregando hemácias de carneiro,

quer hemácias humanas, para o sistema hemolítico, segundo Arantes⁵.

O funcionamento da reação com antígeno tríplice foi estudado por Costa⁷ comparando as curvas de isofixação² obtidas em reações com antígenos isolados e com o antígeno tríplice. As curvas se superpunham, demonstrando a perfeita independência dos sistemas moléstia de Chagas, sífilis e brucelose.

No presente trabalho apresentamos os resultados obtidos com a reação de fixação de complemento, em gotas, com o antígeno tríplice, em soros provenientes de bancos de sangue e de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

* Técnica do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Prof. cat. Dr. José Oliveira de Almeida.

Recebido para publicação em 20.12.75

MATERIAL E MÉTODOS

Soros humanos

Os soros examinados provieram de três amostragens: dos bancos de sangue da cidade de Ribeirão Preto, de 1968 a 1971, totalizando 103.413 soros; do Banco de Sangue da Colresan, de 1971 a 1974, num total de 7.342 doadores e de pacientes do Hospital das Clínicas, matriculados em 1973, com 2282 soros.

Antígenos

Os antígenos usados foram os seguintes: *CARDIOLIPINA 72*, Sylvania, segundo as especificações de Wadsworth¹⁰, suspensão de *Brucella abortus*, segundo Almeida⁴ e os antígenos aquoso⁸ e metílico⁶ de *Trypanosoma cruzi*.

Na composição do antígeno tríplice cada um dos antígenos era diluído ao terço de sua dose de máxima reatividade, misturando-se um volume de cada um deles, com os outros, de forma que cada um ficava diluído apropriadamente.

Técnica da reação

A técnica da reação descrita em detalhe por Almeida³ utiliza salina-borata, três e meia unidades hemolíticas 50% de complemento, uma gota de 0,01 ml de soro e uma gota de 0,02 ml de antígeno. A incubação preliminar é de 90 minutos a 37°C em estufa úmida. Hemácias sensibilizadas são empregadas num volume

de 0,04 ml e o tempo de hemólise é de 60 minutos.

Os soros reagentes se apresentam com as hemácias íntegras e aglutinadas no centro da gota, sendo a aglutinação favorecida por trepidação da placa, produzida por pancadas ligeiras na sua borda.

Reações negativas são as que se mostram totalmente hemolizadas, de gotas transparentes ou com um pequeno depósito aglutinado de estromas residuais.

Em um e outro caso, a gota controle do soro deve se mostrar hemolisada. Quando não, o soro é classificado de anticomplementar.

Todos os soros reagentes foram re-examinados com cada um dos antígenos para o diagnóstico da ou das infecções. É de se notar que alguns soros podem se mostrar reagentes com o antígeno tríplice, e negativos em reações com os antígenos em separado, por efeito da soma de propriedades anticomplementares de cada um dos antígenos com a do soro em questão.

RESULTADOS

Foram examinados 112.365 soros, dos quais 102.741 provinham dos bancos de sangue de Ribeirão Preto, de 1969 a 1974, 2.282 soros eram de pacientes do Hospital das Clínicas (1973-1974) e 7.342 da Colresan (Coleta Regional de Sangue) de 1971 a 1974.

Os resultados obtidos com o antígeno tríplice estão apresentados no Quadro I e aqueles com os antígenos em separado, no Quadro II.

QUADRO I

Resultados dos exames por fixação de complemento com antígeno tríplice para exclusão de Moléstia de Chagas, sífilis e brucelose.

Reação tríplice	Bancos de Sangue de Rib. Preto	Colresan (Doadores)	H. Clínicas (pacientes)	Totais
Reagentes	17136 (16,7%)	474 (6,5%)	669 (29,3%)	18279
Não Reagentes	85605 (83,3%)	6868 (93,5%)	1613 (70,7%)	94086
Totais	102741	7342	2282	112365

QUADRO II

Resultados dos exames feitos nos soros reagentes (com antígeno tríplice) com cada um dos antígenos: Cardiolipina, Suspensão de Brucelas e antígeno de *Trypanosoma cruzi*.

(Soros dos Bancos de Sangue, com exclusão da Colresan)			
Ant. de <i>Tryp. cruzi</i>	Cardiolipina	Susp. Brucelas	Totais
+	-	-	12803
+	+	-	566
+	-	+	86
-	+	-	3325
-	+	+	20
-	-	+	336
13455 (78,5%)	3911 (22,8%)	442 (2,6%)	17136
Soros de pacientes do Hospital das Clínicas			
+	-	-	600
+	+	-	16
-	+	-	46
-	-	+	7
616 (92,1%)	62 (9,3%)	7 (1,0%)	669
Soros de Doadores da Colresan (*)			
+	-	-	358
+	+	-	5
-	+	-	96
+	-	+	1
-	-	+	14
364 (76,8%)	101 (21,3%)	15 (3,2%)	474

(*) Coleta Regional de Sangue de Ribeirão Preto.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O exame sorológico dos doadores de sangue e dos pacientes que procuram assistência médica, quando feito em rotina, permite a avaliação das endemias prevalentes na região.

Quando o número de soros a examinar é grande, é altamente conveniente o emprego de técnicas que permitam a exclusão imediata dos soros "negativos" podendo-se então fazer o re-exame dos soros reagentes, para a identificação da ou das infecções presentes.

A reação de fixação de complemento em gotas sobre placas de plástico^{3,9} por suas características de precisão, economia de trabalho e de material, foi empregada, utilizando-se um antígeno composto de cardiolipina¹⁰, suspensão de brucelas⁴ e do antígeno metílico de *T. cruzi*⁶.

No antígeno tríplice empregamos o antígeno metílico⁶ por sua grande sensibilidade, enquanto no exame dos soros reagentes, utilizamos o antígeno aquoso⁸ por ser este mais específico para soros chagásicos.

O teste inicial em gotas, com o antígeno tríplice, permitiu excluir como soros *não reagentes* para sífilis, brucelose e moléstia de Chagas, uma proporção que variou de 70,7% a 93,5% dos soros examinados (Quadro I).

Os soros reagentes com o antígeno tríplice foram re-examinados, pela mesma técnica em gotas³, com cada um dos antígenos, diluídos em dose de máxima reatividade, para identificar a ou as infecções presentes. Os resultados foram apresentados no Quadro II.

Observando esses resultados, verifica-se que quando os doadores são selecionados por um

cuidadoso interrogatório, a percentagem de chagásicos é muito menor.

Assim entre doadores de sangue da Colresan somente 5% eram chagásicos, enquanto entre os dos outros hospitais chegava a 13%. A maior incidência de chagásicos entre doadores dos bancos de sangue dos hospitais decorre da prática de se solicitar aos familiares dos pacientes, doação de sangue. Como em grande parte são pacientes provenientes de zonas endêmicas de doença de Chagas, seus familiares podem estar infectados, como sugere a maior incidência da moléstia (27%) entre pacientes hospitalizados (Quadro III).

QUADRO III

Comparação dos resultados obtidos nos Testes de Fixação de Complemento, em pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e em doadores de sangue

	Mol. Chagas	Sífilis	Brucelose	Total
Bancos de Sangue	13819 (12,6%)	4012 (3,6%)	457 (0,4%)	110083
Hosp. das Clínicas	616 (27,0%)	62 (2,7%)	7 (0,3%)	2282
	14435 (12,8%)	4074 (3,6%)	464 (0,4%)	112365

Da experiência acumulada no uso do antígeno tríplice em reações de fixação de complemento em gotas, pode-se concluir de sua praticabilidade, recomendando-se para hospitais, bancos de sangue e laboratórios de saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Deixamos aqui nossos agradecimentos à Srta. Margarida Fávero pela assistência dada no preparo dos reagentes.

SUMMARY

The complement-fixation in drops, using a triple antigen, was employed for screening out sera from Chagas' disease, syphilis or brucellosis. A total of 112,365 sera were tested, from which 18,279 reacted with the triple antigen (composed of cardiolipin, suspension of brucellas and T. cruzi antigen). All the reactive sera were retested with each one of the antigens, in order to identify the infection. Chagas' disease was found in the proportion of 77% to 88% in this group, syphilis from 8% to 23% and 1% to 3% reacted with brucella antigen.

The use of a triple antigen in the complement-fixation test in drops has been very suitable for screening out reacting sera for Chagas' disease, syphilis and brucellosis, not only for the selection of blood donors, but also for the routine of serology in public health laboratories and hospitals, when large number of sera are to be tested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.O., PEDREIRA DE FREITAS, J.L. & BRANDÃO, H. Complement-fixation test with triple antigen for syphilis, tuberculosis, leprosy or Chagas' disease. *Amer. J. Trop. Med.*, 3:490-494, 1954.
2. ALMEIDA, J.O., Isofixation curves as a method for standardization of quantitative complement-fixation test. *J. Immunol.* 76:259-263, 1956.
3. ALMEIDA, J.O., Técnica de la reaccion de fijacion del complemento en gotas, para excluir donadores de sangre chagasicos. *Bol. Ofic. San. Panam.*, 55:133-145, 1963.
4. ALMEIDA, J.O., Estudos sobre a reação de fixação de complemento de brucelose. 1. Influência da ordem de se misturar antígeno, anticorpo e complemento, sobre a quantidade de complemento fixado. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 9:63-72, 1967.
5. ARANTES, M.A.A., Emprego da reação de fixação de complemento em gotas com um antígeno tríplice e sistema hemolítico anti-homem, em bancos de sangue. Tese da Fac. Med. Ribeirão Preto. Mimeografado, 62 pgs. 1970.
6. BARACCHINI, O., COSTA, A. & CARLONI, J., Emprego do calor e do metanol no preparo de antígeno de *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital*, 68:193-199, 1965.
7. COSTA, A., Estudo da reação de fixação de complemento com antígeno tríplice. Tese da Fac. Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto. Mimeografado, 134 pgs., 1964.
8. FREITAS, J.L.P. & ALMEIDA, J.O., Nova técnica da fixação de complemento para moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital (Rio de Janeiro)*, 35:787-800, 1949.
9. FULTON, F. & DUMBELL, K.R., The serological comparison of strains of influenza virus. *J. Gen. Microbiol.*, 3:97-111, 1949.
10. WADSWORTH, A.B., Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. Third Ed. The Williams and Wilkins Co., 1947.