

PREPARO, PADRONIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS EM REAÇÕES QUANTITATIVAS DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO COM SOROS DE DOENTES DE LEPROSA

DR. JOSÉ OLIVEIRA DE ALMEIDA (*)

INTRODUÇÃO

A reação de fixação do complemento para a lepra, conhecida como reação de EITNER tem sido empregada entre nós, não em rotina hospitalar, mas como instrumento de investigação científica.

Os antígenos empregados têm variado, desde extratos de lepromas até frações extraídas de bactérias álcool-ácido resistentes, mas de um modo geral, a reação de EITNER tem se mostrado de valor no estudo da sorologia da lepra em suas diversas formas, tendo sido evidenciado certo paralelismo entre reatividade sérica e estado clínico do paciente.

Neste trabalho apresentamos um estudo sistemático da reação de fixação de complemento para a lepra, com a padronização dos diversos elementos da reação e com a descrição pormenorizada dos métodos utilizados na preparação de antígenos.

Utilizamos a técnica de fixação do complemento descrita por WADSWORTH, MALTANER e MALTANER para os sistemas sífilis e tuberculose. Os resultados obtidos por esse método tem se mostrado de grande utilidade não só no diagnóstico de infecções como para o controle do tratamento.

De 1952 a 1953 empregamos o antígeno descrito por PADRON (1952) no estudo sorológico de pacientes do Sanatório Padre Bento, com a finalidade de colher informações a respeito da reatividade do soro de doente de lepra durante as diversas fases por que passa o doente durante o tratamento pela sulfona.

O *antígeno aquoso precipitado* era um passo avante do antígeno preparado simplesmente por ebulição em água destilada de bacilos da tuberculose, previamente tratados pela acetona, segundo o método de MALTANER.

O antígeno de MALTANER não só era difícil de se manter como também possuía pequeno poder fixador do complemento. O antígeno aquoso precipitado de PADRON conservava-se melhor e seu título era maior, em presença de soro de lepra que outro preparado da mesma partida de bacilos, pela técnica de MALTANER.

O estudo dos doentes do Sanatório Padre Bento foi feito com uma única partida de antígeno; os resultados obtidos puderam ser comparados, uma vez que antígenos aquosos são difíceis de serem reproduzidos. Esse antígeno, no entanto, era turvo, apresentando parte que se precipitava depois de uma semana, quando mantido em geladeira. Propriedades anti complementares apareciam concomitantemente, obrigando-nos a fazer semanalmente a diluição do antígeno liofilizado.

O problema do antígeno a ser utilizado na sorologia da lepra deveria ser reinvestigado e por sugestão nossa foi organizado um programa de estudos

(*) Prof. Cat. do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

sistemáticos envolvendo a comparação de atividade antigênica, métodos de avaliação e a purificação dos antígenos propostos para as reações quantitativas de fixação do complemento.

O presente trabalho investiga as relações quantitativas entre sôro de doente de lepra e os antígenos solúveis em piridina. A experiência de BIER e ARNOLD (1935) em lepra, com o antígeno de WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN indicava ser o princípio ativo do bacilo da tuberculose e que reagia com sôro de lepra, solúvel em piridina.

PANGBORN (1956), seguindo o método de WITEBSKY ET AL. (1931) para a extração dos princípios antigênicos do bacilo da tuberculose, verificou sua solubilidade em água, éter e álcool. O antígeno preparado pelo novo método é descrito neste trabalho.

Ulterior fracionamento do antígeno solúvel em piridina levou ao isolamento de uma fração específica, encerrando praticamente tôda a atividade antigênica do preparado original.

Durante a experimentação com essas frações e sôro de lepra, tivemos ocasião de verificar a impropriedade de certos conceitos adotados na reação quantitativa de fixação do complemento utilizada em ALBANY, N. Y. Consideramos então outros métodos para apreciar o fenômeno de fixação de complemento, como por exemplo, a determinação do título do sôro, o abandono do título por quociente e apresentamos as chamadas "curvas de isofixação do complemento" como método para o estudo das relações entre sôro, antígeno e complemento.

Nêste trabalho estudamos a reação de fixação do complemento para a lepra com o antígeno aquoso de PADRON e com as frações purificadas ativas extraídas dos antígenos solúveis em piridina. É mais um roteiro de métodos e não pretende mais que dar uma contribuição ao estudo da sorologia da lepra; o valor da reação de EITNER como meio semiológico na apreciação do tratamento da leprose será objeto de publicação a ser feita brevemente, quando apresentaremos as curvas sorológicas levantadas em soros de pacientes em tratamento.

A REAÇÃO DE EITNER. ESBOÇO HISTÓRICO

Quando em 1906 EITNER experimentou um extrato de leproma com sôro de doente de lepra em uma prova de fixação de complemento, já a literatura médica assinalava semelhantes reações praticadas com bacilos da tuberculose e sôro de tuberculoso.

Dois anos mais tarde EITNER examinava um sôro de doente de lepra com um antígeno preparado de coração de cobaia; obteve resultados positivos na reação de fixação do complemento, semelhantes aos por ele descritos anteriormente em 1906.

A reação seria específica para a lepra ou havia um particular comportamento do sôro do hanseniano?

STATINÉANU e DAMELOPOLU em 1908 descreviam anticorpos específicos no sôro leproso, mas já no ano seguinte assinalavam reações entre suspensões coloidais salinas de lecitina e soros de lepra.

Era de se esperar, dado o parentesco entre os bacilos da lepra e o da tuberculose, que soros de doentes de lepra pudessem reagir em provas de fixação do complemento com suspensões bacilares. Já em 1909 FRUGONI e PIZANI obtinham reações positivas examinando onze soros de doentes de lepra com suspensões de bacilos da tuberculose.

Antígenos preparados de lepromas conservados em álcool podiam ainda reagir com soros de lepra, segundo BABES e BUSILA (1909).

A preferência dos investigadores orientou-se no emprêgo de antígenos preparados de bacilos da tuberculose, porque eram mais fáceis de se obterem e por se procurar uma reação sorológica para a tuberculose. Os casos de lepra estudados na ocasião eram raros e as reações eram praticadas por aquêles sorologistas empenhados nos estudos de tuberculose.

Em 1910 STENFFENHAGEN obtinha três reações positivas em oito soros de doentes de lepra, com o antígeno preparado de suspensões de bacilos de KOCH; em 1913 WILLIS teve ocasião de estudar treze soros de lepra com antígenos preparados de diversas espécies de "bacilos da lepra", de "bacilos da tuberculose", variedades humana e bovina, e outros ácido resistentes saprófitas. Obteve reações positivas com os diversos antígenos, definindo então a "capacidade prolixadora" do soro leproso. Os anticorpos encontrados na leprose seriam relacionados com todo o grupo de microrganismos álcool-resistentes. Haveria no soro, anticorpos antiácido graxos; na tuberculose os anticorpos seriam diferentes, embora houvesse notável reciprocidade no comportamento dos soros de lepra e dos de tuberculose.

As relações imunobiológicas entre lepra e tuberculose foram estudadas por MUCH (1913); no ano anterior, numa reunião da Sociedade de Medicina e Higiene, em Londres, em 16 de fevereiro, tivera ocasião de mostrar a semelhança entre os anticorpos da lepra e da tuberculose e foi quase proféticamente que dizia talvez ser possível produzir uma imunização para ambas as infecções.

Trabalhos esporádicos sobre fixação de complemento com antígenos de lepromas somavam até 1915 um total de 185 reações, com 75% de positividade na forma cutânea, contrastando com 25% observados na forma anestésica; tôdas essas reações tinham sido praticadas com antígenos alcoólicos; os resultados obtidos com antígenos aquosos indicavam maior positividade, com 84% na forma cutânea e 41% na forma anestésica.

Reações com antígenos bacterianos somavam 279 até 1916, com 180 delas praticadas com tuberculina bruta de KOCH, com positividade de 68%; 89 soros testados com suspensões bacilares indicavam reatividade em 83%.

Em 1919 COOK estudou 20 casos de lepra, empregando 19 diferentes antígenos, preparados de culturas de "bacilos da lepra", bacilos tuberculosos, difteróides e ácidos resistentes saprófitas. Mostrou que anticorpos fixadores de complemento estavam presentes em grande concentração em soros de doentes de lepra na forma nodular. Esses soros teriam tendência para dar reações positivas com o antígeno de WASSERMANN, porém, semente em baixas diluições. A fixação de complemento era positiva com todos os antígenos de bactérias álcool-ácido resistentes e daí a impropriedade da reação como argumento favorável a atribuir a certas culturas de organismos isolados de lepromas, papel etiológico específico.

Essa propriedade de multi-fixação do complemento seria, na opinião de LEWIS e ARONSON (1923) um caráter diagnóstico do soro de lepra, pois não obtiveram com soros sífilíticos ou tuberculosos a percentagem de 93% de reações positivas quando praticadas com antígenos de bactérias ácido resistentes, em 26 casos examinados.

Os antígenos de LEWIS e ARONSON (1923) eram suspensões aquosas de culturas (Bacilo da lepra de CLEGG, de DUVAL, de KEDROWSKY, bacilo do esmegma). A extração com acetona retiraria a gordura, permitindo uma suspensão mais estável, segundo TAYLOR e MALONE (1924), que examinaram 100 soros de lepra, com positividade de 90%. Contrôles consistindo de 14 soros normais e 23 sífilíticos deram reações negativas, enquanto 30 casos de tuberculose apresentaram 6 reações; o antígeno empregado era uma suspensão a 2% em salina de bacilos desengordurados pela acetona.

No BRASIL, GOMES (1927) utiliza-se de um antígeno preparado com o "Streptothrix lepróide" de DEYCKE; examinando 83 doentes de lepra em reações de fixação do complemento encontrou positividade de 82%; a forma tuberosa com 89%, a mista com 95%, a maculo-anestésica com 70% e a forma frusta com 50%; na forma nervosa a positividade foi de 87%.

No mesmo ano FREUND observava que a lecitina aumentava o poder anti-gênico do extrato alcoólico de *Streptothrix* até 200 vezes, em provas de fixação

O trabalho de GOMES despertou grande interesse entre os leprologistas; a reação teria grande valor no diagnóstico precoce da lepra (GOMES e PATTEO, 1928) e na profilaxia da infecção (MARCONDES, 1929).

Em 1928 SOUZA LIMA apresentou os resultados obtidos com a reação de GOMES em 96 doentes de lepra; em 9 casos de lepra tuberosa, 8 reagiram; 40 reações positivas em 42 soros de lepra mista; 37 casos de lepra nervosa com 28 positivas; em 8 pacientes de forma frusta, apenas 4 reações foram positivas; examinando 28 comunicantes, encontrou 9 reações positivas. Incluiu controles consistindo de 46 casos de tuberculose, com reações ligeiramente positivas.

GOMES em uma série de publicações entre 1927 e 1935 aponta a utilização da reação de fixação de complemento nos serviços de rotina dos leprosários e também para o controle dos comunicantes (GOMES, 1935). Os doentes de lepra poderiam ser sensibilizados por administração de iodeto de potássio, com maior positividade sorológica (GOMES e ANTUNES, 1930). A reação de GOMES-DEYCKE, teria também sua aplicação na descoberta da lepra latente (FAILLACE, 1931; GOMES, 1931).

Em 1931, WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN descrevem o antígeno solúvel em piridina e benzol, extraído do bacilo da tuberculose; o antígeno era estável e reprodutível, sendo desde então até 1939 produzido comercialmente pela casa BAYER.

O antígeno se destinava à sorologia da tuberculose, mas BRANTS (1932) o aplicou em 80 soros de lepra, encontrando 74 reações positivas; as seis reações negativas se localizavam entre pacientes de forma nervosa. Das 50 reações positivas em lepra tuberosa, 43 o eram fortemente; isso contrastava com 15 reações fracamente positivas encontradas em 20 soros positivos da lepra nervosa; o antígeno de WITEBSKY era nitidamente superior ao antígeno proposto por BESREDKA (1914).

Resultados semelhantes foram obtidos por AOKI e MURAO (1933) que obtiveram com êsse antígeno 9 reações positivas em 16 doentes de lepra com a forma tuberosa e 9 em 24 casos de forma nervosa. Quatro soros em 10 de tuberculose reagiram enquanto apenas um mostrou reação entre 5 sífilíticos.

KORNEL (1933) obteve 10 reações positivas em 10 casos de lepra cutânea; uma reação foi negativa em 3 pacientes de lepra maculosa; fracas reações em dois casos suspeitos mas em 3 comunicantes duas reações foram fortemente positivas. Soros de tuberculose, em número de 10, mostraram apenas 4 reações positivas. Comparando seus resultados com o antígeno W. K. K. com os obtidos com antígenos preparados de lepromas, achou concordância em lepra, mas não em tuberculose. Soros de lepra deram WASSERMANN positivo, mas não os soros de tuberculose. Soros sífilíticos reagiram com antígenos preparados de lepromas, mas não com o antígeno de WITEBSKY (W. K. K.).

No BRASIL a reação de GOMES continuava a ser praticada; em 1935 ASSUMPCÃO e SILVEIRA obtinham 90% de positividade na lepra cutânea, 85% na lepra nervosa e 70% na forma mista. Em seu trabalho relatam ter encontrado 70% de positividade em leishmaniose.

Em 1935 BIER e ARNOLD examinaram 272 casos de lepra, empregando o antígeno W. K. K.; obtiveram 79% de reações positivas. Nos casos de forma mista (186 casos) a incidência foi de 94%; a lepra nervosa (14 soros) reagiu com 57% enquanto em 72 casos de lepra incipiente a positividade foi apenas de 44%. O valor da reação de fixação de complemento na lepra foi mais uma vez apontada por BIER (1936) em um estudo sobre a sorologia da lepra. Confirma o achado de ASSUMPCÃO e SILVEIRA, na reação cruzada entre W. K. K. e leishmaniose.

Entre nós, outros autores consagram o emprêgo da reação de fixação do complemento na lepra, com o antígeno de WITEBSKY (PEREIRA, 1936; RABELLO FILHO e MACHADO, 1936; RABELLO FILHO, MACHADO e PINTO, 1938; PEREIRA, 1938).

O método de WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN, poderia ser empregado no preparo de antígenos a partir do *Streptothrix* de DEYCKE (BIER e PLANET, 1936). As reações não seriam tão intensas, podendo haver causas de erros em soros fracamente positivos.

O soro leproso reagia intensamente com o antígeno de W. K. K.; 50 reações positivas em 51 casos de lepra tuberosa; na forma nervosa a positividade era menor (74% em 39 casos), segundo BIER e PLANET (1936). O antígeno de W. K. K. era no entanto capaz de reagir com outros soros "lábeis" como de pênfigo e leishmaniose. Em 13 casos de pênfigo esses autores encontraram 5 reações positivas (38,5%) e 26 soros de leishmaniose, em um grupo de 34, reagiram (76,5%). Em soros não lábeis WASSERMANN negativos (74 soros) encontraram apenas 4% de reações positivas; em 51 soros WASSERMANN positivos encontraram 7 positivos com W. K. K. (13,7%).

O antígeno de W. K. K. poderia ser utilizado no reconhecimento das formas clínicas da lepra, pois as formas tuberculóides apresentavam em 70% dos casos, reações negativas, segundo RABELLO FILHO e PINTO.

Os resultados obtidos na Índia por GREVAL, LOWE e BOSE, (1939), confirmavam integralmente os achados da escola de BIER; em 12 casos de lepra lepromatosa, tiveram esses autores apenas uma reação negativa; na forma nervosa da infecção houve alta positividade, 37 reações em 38 soros. Os títulos dos soros eram altos, até 1:150; os soros contrôles, 25 soros sífilíticos deram reações negativas, com exceção de um, com reação fracamente positiva com W. K. K. Assinalam a reação com soros de calazar e apontam a pouca especificidade da reação.

Os três tipos de lepra, lepromatosa, nervosa e mista, diferiam em seu comportamento sorológico de maneira tão nítida que haveria razões para afirmar que a resposta imune era provocada pela presença do bacilo da lepra, segundo ROW, (1939).

O trabalho de BIER em leishmaniose e antígeno W. K. K. foi confirmado por LOWE e GREVAL (1939) em 17 casos de calazar e 3 de leishmaniose cutânea. Em se tratando de lepra e calazar a reação com a última infecção seria de maior intensidade, segundo GREVAL, LOWE e BOSE (1939).

Antígenos preparados de culturas de bacilos da lepra de ratos, com ou sem cefalina, foram utilizados por ICHIATA em 1940, em um inquérito soro-lógico entre crianças com longo contacto com doentes de lepra em Shorokuto, na Coreia. Dentre 34, duas crianças apresentaram reações positivas. Uma delas mostrou sintomas de lepra dois anos depois. O autor acredita estar em face de um antígeno específico para a lepra e o recomenda para o diagnóstico precoce da infecção.

Antígenos aquosos de bacilos da tuberculose, previamente extraídos com acetona, reagiram com 47 soros de lepra, em reação de fixação de complemento quantitativa (MALTANER E. 1940); títulos mais altos foram encontrados na forma cutânea.

A reação de fixação de complemento com soro de doente de lepra e antígenos preparados de bactérias ácido resistentes isoladas de lepromas, não podia servir de argumento para identificar o papel etiopatogênico das culturas, segundo DHARMENDRA e BOSE (1941) e DHARMENDRA (1941), pois antígenos preparados de culturas de bacilos de DUVAL, de BAYON, de KEDROWSKY e de LLERAS, assim como bacilos da tuberculose e *M. phlei*, deram reações praticamente iguais com 12 soros de lepra lepromatosa. Experiências com absorção de soros com suspensões bacilares e filtração mostraram-se incapazes de distinguir as diferentes culturas testadas (DHARMENDRA, 1941).

O trabalho de BIER e PLANET (1936) indicando a reatividade do Mire, de leishmaniose com o antígeno de W. K. K. continuava a ter larga repercussão na Índia. GREVAL, CHANDRA e DAS (1941) recomendaram seu uso em rotina. LOWE (1942) experimentou o antígeno de W. K. K. não só em lepra como em calazar, obtendo resultados muito nítidos na lepra nodular e na leishma-

niose. A reação seria mais precoce que o teste à formalina. Na forma nervosa da lepra a reação seria de pouca utilidade, em vista da baixa percentagem de reações positivas. O sôro de calazar teria maior poder de reação com o antígeno de W. K. K. que o próprio sôro de lepra. LOWE compara a reação com o calazar ao WASSERMANN em sífilis secundária.

O antígeno de W. K. K. foi experimentado em dermatoses tropicais por EICHBAUM (1942) que examinou 300 soros incluindo leishmaniose, pênfigo, lepra, blastomicose e casos contrôles de tuberculose pulmonar. A percentagem de reações positivas nas diversas entidades clínicas foi a seguinte: leishmaniose 20%; pênfigo 20%; lepra 88%; blastomicose 0%; tuberculose pulmonar 27%. Os anticorpos responsáveis pela reação foram analisados por provas de absorção específica, quer com o mesmo antígeno de W. K. K. quer com suspensões de bacilo da tuberculose. Semente soros de tuberculose eram facilmente absorvidos; os soros de lepra puderam ser divididos em dois grupos: um semelhante ao sôro tuberculoso, pois mostra absorção integral dos anticorpos, com o antígeno de W. K. K., porém difere do grupo tuberculoso, por não se deixar absorver com suspensões de bacilos de KOCH; outro grupo de soros de lepra não se deixaria absorver nem pelo antígeno de W. K. K. nem por suspensão bacilar. Os soros de leishmaniose, pênfigo e blastomicose se comportam de maneira semelhante aos soros de lepra do segundo grupo. Isso seria um caráter de "labilidade sérica" não necessariamente demonstrável pela reação de WASSERMANN, mas capaz de ser evidenciada por outro antígeno lipóidico como o de WITEBSKY.

A reação entre lecitina e sôro de lepra foi estudada por EICHBAUM (1942), empregando lecitina de ovo, do comércio, e de diversas marcas, tanto em provas de floculação como de fixação do complemento. Em 229 soros de lepra obteve 141 reações positivas (61%); a maior frequência (72%) foi encontrada na lepra tuberosa e mista, enquanto apenas 37% na forma máculo anestésica. A reação com lecitina concordaria com 80% das reações WASSERMANN positivas no grupo de doentes de lepra. Em 335 contrôles, incluindo 151 soros sífilíticos e tuberculosos, leishmaniose, gravidez, a reação com a lecitina foi positiva em 4% dos soros provados. Maior incidência (8%) foi achada entre os soros sífilíticos. Os anticorpos ou reagina anti-lecitina teriam sua formação relacionada à ação dos fosfatídeos haptenicos liberados do tecido doente (EICHBAUM, 1942); poderia no entanto haver antígenos comuns presentes no bacilo de HANSEN, em ovos, tecidos de mamíferos, bactérias, fungos. Essa ubiquidade de substâncias lipóides explicaria a "polifixação" dos soros leprosos (EICHBAUM, 1942).

O antígeno de W. K. K. continuava a ter grande emprêgo na sorologia da lepra e do calazar na ÍNDIA (SEN GUPTA 1945; DHARMENDRA, BOSE e SEN GUPTA, 1946; GREVAL, 1947; SEN GUPTA, 1948).

A reação obtida com o calazar com o antígeno de W. K. K. seria igualmente demonstrável com antígenos metílicos segundo BAYARRI e AHUIR (1947), que em 20 pacientes com punção esplênica positiva para leishmânia, obtiveram 18 reações de fixação de complemento positivos com o antígeno de BOQUET e NÈGRE.

Na impossibilidade de se obter o antígeno original de W. K. K., os indús prepararam antígenos pela técnica original de WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN, a partir de culturas do bacilo de KEDROWSKY (DHARMENDRA, BOSE e SEN GUPTA em 1946) e os usaram com bons resultados no Serviço do Calazar, da Escola de Medicina Tropical de CALCUTÁ: a reação foi 94,6 específica para o calazar em 1917 soros examinados de pacientes com leishmânias demonstradas com o teste de aldeido positivo.

Em 1956, ALMEIDA, CARVALHO e PADRON, publicaram os resultados de um inquérito sorológico feito no Sanatório Padre Bento durante os anos de 1952 e 1954; o antígeno foi preparado de bacilos da tuberculose pela técnica de PADRON (1952). Todos os pacientes, em número de 534, foram examinados

radiologicamente para exclusão da tuberculose. Os anticorpos fixadores de complemento foram titulados pelo método das seis unidades de complemento. O primeiro grupo de doentes sem tratamento, num total de 74 casos, mostravam bacilos de HANSEN nas lesões cutâneas e na mucosa nasal; 19% dêles tinham títulos menores que 10; 51% títulos entre 10 e 100 e 30; 4 títulos maiores que 100. O segundo grupo com 270 pacientes em tratamento não mais apresentavam bacilos no muco nasal mas semente nas lesões cutâneas. Os títulos em fixação de complemento eram menores que 10 em 33% dêles; entre 10 e 100 em 52% e maiores que 100 em 15r/o. O terceiro grupo de 243 pacientes tratados pela sulfona apresentava resultados negativos na lesão e no muco. Neste grupo os títulos eram menores que 10 em 70% dos casos; entre 10 e 100 em 27% e maiores que 100 apenas em 3%. O grupo contrôle "lepra negativa" era constituído de 786 doadores de sangue, supostos normais. Trinta e sete soros reagiram com o antígeno aquoso precipitado, com 3 unidades de complemento, dando uma incidência de 4,7% de resultados positivos em pessoas presumivelmente sadias. Esse grupo não foi examinado radiologicamente (ALMEIDA, PEDREIRA DE FREITAS e BRANDÃO, 1954).

A incidência de reações positivas com antígeno aquoso foi de 4,4%, em um grupo de 205 pessoas normais; em outro grupo de 403 soros, a percentagem de títulos maiores que 3 foi de 13,6% (MALTANER, 1938).

Até 1953 PANGBORN tentou isolar a fração antigênica do bacilo da tuberculose, partindo do extrato aquoso.

Por nossa iniciativa e insistência, o antígeno de W. K. K. foi preparado por PANGBORN (1956) e utilizado na sorologia da tuberculose e lepra em ALBANY, N. Y. A reação de EITNER poderia então ser estudada quantitativamente, podendo se fazer um estudo comparativo entre os dois grupos de antígenos propostos: aquosos e solúveis em piridina.

ANTÍGENOS NA REAÇÃO DE EITNER

A reação de fixação do complemento em lepra, na maior parte das vêzes, era feita ocasionalmente, por sorologistas empenhados na pesquisa de antígenos específicos para a tuberculose.

São trabalhos esparsos, os autores geralmente não insistindo no prosseguimento de suas pesquisas. A dificuldade na obtenção de soros de lepra, na EUROPA, é justificativa para os poucos trabalhos aparecidos desde 1906; de outro lado o problema da lepra era mais colonial e não metropolitano.

Na ÍNDIA onde lepra é endêmica, a reação com o antígeno tuberculoso de W. K. K. foi mais empregada no estudo do calazar que propriamente para a descoberta de casos de lepra.

A falta de um tratamento específico, fazia dos leprosários, grandes depósitos de doentes. A rotina do tratamento chaulmúrgico não incentivava a pesquisa sorológica.

No BRASIL, no entanto, o estudo das reações de fixação do complemento foi feito de modo sistemático. GOMES (1927) estudou a aplicação de sua reação em lepra; em 1931 concluiu ser a reação do *"desvio do complemento de alto valor não só no diagnóstico precoce, como para determinar o grau de infecção"* e ainda conclue *"nos casos de lepra obscura, lepra ganglionar, quase sem sintomas, o seu valor mais se afirma, pois os casos de lepra soro-negativos são em geral benignos"*. Estudando 119 casos de lepra, achou certa relação entre baciloscopia positiva no muco nasal e reação de fixação do complemento.

BIER (1935, 1936) estudou a reatividade do soro de lepra com antígenos lipóidicos. Apontou a existência de reações de fixação de complemento com lipóides ubiçuitários (tipo WASSERMAN) como com lipóides bacterianos ou de lepromas.

BIER e ARNOLD, 1935, definem a reação de fixação de complemento em lepra, não como consequência do poder "polifixante" do soro leproso, ou da marcada labilidade de suas proteínas, mas como verdadeira reação específica.

Em 1957, em seu livro "Bacteriologia e Imunologia", BIER afirma: *"uma reação positiva com o antígeno de W. K. K., excluída a tuberculose e difteria, bem como certos casos em que o sêro dá reações inespecíficas de labilidade (em particular no pênfigo e na leishmaniose), deve ser interpretada como lepra, máxime se houver suspeita clínica"*.

Para êsse autor era ponto pacífico afirmar o valor diagnóstico da reação de fixação do complemento em lepra. O antígeno utilizado pela escola de BIER era o de WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN, específico na tuberculose, mas *"insensível à labilidade das proteínas do sêro tuberculoso, e, ao mesmo tempo, isento de lipóides fixadores de complemento em presença de sêro sífilítico"* (BIER, 1936).

Uma exata reprodução do antígeno de WITEBSKY não pôde ser feita por BIER e PLANET (1935), pois *"as fixações não atingiam a tão altas diluições, e, por esse motivo, deixam em dúvida certos resultados de sêros fracamente positivos"* (BIER 1936). O antígeno preparado por BIER possuía diferente capacidade fixadora, *"a maior discordância entre os dois antígenos foi encontrada em cinco casos de blastomicose que deram reação fraca ou forte com o antígeno original (W. K. K. Bayer), enquanto com o antígeno de BIER, reagiram todos negativamente"* (EICHBAUM, 1942).

Tentativas têm sido feitas para se isolar a fração específica do bacilo da tuberculose. PINNER (1926). estudou o comportamento sorológico de setenta diferentes antígenos preparados de culturas de bacilos da tuberculose, demonstrando que o antígeno específico estava associado à fração insolúvel na acetona, no éter e no clorofórmio e que era solúvel em água e álcool.

É extremamente perigoso afirmar propriedades de antígenos complexos por suas propriedades de solubilidade, pois a presença de certas frações nas misturas altera completamente suas propriedades; o fenômeno é conhecido como "solubilização recíproca" e é particularmente evidente entre os fosfolipídeos (FAURE, 1940).

O extrato aquoso, preparado por ebulição em água destilada de bacilos da tuberculose previamente tratados pela acetona, reagia com sêro tuberculoso e de lepra, mas não com sífilis (WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, 1925). O antígeno conteria lípidos e provavelmente polissacarídeos.

Polissacarídeos presentes em antígenos aquosos seriam os responsáveis por sua atividade antigênica (SEIBERT, 1941); nas reações sorológicas de fixação do complemento o hapteno estaria associado à fração glicídica (MEYER, 1937). As proteínas desnaturadas pelo tratamento químico empregado eram ainda capazes de adsorver carboidratos que então reagiriam com os soros imunes (ANDERSON, 1927).

A existência de um antígeno protéico foi demonstrada por SCHAEFER, 1940, em preparados de culturas do bacilo da tuberculose. No sêro de tuberculosos haveria anticorpos que reagiriam quer com a fração protéica quer com a fração polissacarídica.

A atenção dos pesquisadores foi no entanto focalizada na atividade sorológica demonstrada pela fração lipídica fosforada (ANDERSON, 1927; PINNER, 1928). Na opinião de CHARGAFF e SCHAEFER (1935) e MACHEBOEUF e seus associados (1935, 1939) a atividade fixadora do complemento estava ligada a um fosfolipídeo.

É bastante difícil se orientar quando se computam os trabalhos relacionados ao fracionamento do bacilo da tuberculose, pois muitos dêles não fazem referência às propriedades sorológicas das frações isoladas. Outras frações, aparentemente relacionadas, têm comportamento diverso; assim o fosfatídeo de ANDERSON (1927) continha 0,4% de nitrogênio, enquanto o isolado por MACHEBOEUF (1935, 1937) não continha êsse elemento. Suas propriedades não eram as mesmas; enquanto o preparado de ANDERSON fixava o complemento (PINNER, 1928; DOAN, 1929) o de MACHEBOEUF não possuía nenhuma atividade sorológica, *"in vitro"* ou *"in vivo"*.

O antígeno de WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN, solúvel em benzol e piridina conteria lipóides e talvez fosfolipídeos associados a polissacarídeos.

Em 1940 FAURE publicou seus estudos sobre "os haptenos lipóidicos da fixação da alexina" isolados dos "bacilos da tuberculina". É de interesse focalizar suas conclusões, pois pela primeira vez é compreensível a relação existente entre os antígenos aquosos e os antígenos lipóidicos. Suas conclusões podem assim ser resumidas:

1.º Pode se extrair o hapteno lipóidico contido nos bacilos da tuberculina, diretamente pela água. Nos extratos aquosos o hapteno lipóidico acompanha igualmente os fosfatídeos, da mesma forma que nos extratos alcoólicos de bacilos.

2.º — A afinidade do hapteno lipóidico para a água é tal que é praticamente impossível sujeitar a sua solução etérea à lavagem com água, pois êle imediatamente passa para fase aquosa.

3.º — O hapteno lipóidico é insolúvel na acetona fervente.

4.º — A ação combinada da água, éter, acetona e cloreto de sódio permite lavar a solução aquosa de fosfatídeos, com bom rendimento.

5.º — Os preparados mais ativos se apresentam em solução clorofórmica, como uma solução perfeita. Por evaporação do solvente, o resíduo toma uma aparência vitrosa, transparente, quase incolor. A fração mais ativa em fixação de complemento é solúvel em clorofórmio, no éter, na piridina e no ácido acético glacial; pouco solúvel no álcool metílico e insolúvel na acetona.

6.º — O hapteno, em contacto com a água, transforma-se em um gel viscoso, porém límpido. Forma solução óticamente vazia, comportando-se no entanto como colóide, pois apresenta o fenômeno da precipitação reversível pelos sais neutros e por acidificação e não se dialisa em membrana de colódio.

7.º — A composição química do hapteno é semelhante à dos ácidos graxos, associados a glúcides; são azotados na proporção de 3%; os preparados mais ativos sorológicamente parecem consistir de sais de sódio, cálcio e magnésio de ácidos fosfatídicos, como complexos de ácidos glicerosfosfatídicos.

8.º — A atividade haptênica dos preparados mais ativos é perdida quando se faz o fracionamento dos fosfatídeos ácidos. A atividade antigênica estaria ligada a uma pequena parte dêles.

9.º — O hapteno é de natureza lipídica, pois sua atividade acompanha sempre os fosfatídeos e nos diversos fracionamentos ela sempre é achada entre os lipídeos.

10.º — Após múltiplos fracionamentos vê-se o hapteno se concentrar em uma solução que não contém proteínas, nem glúcides livres, mas que possui ácidos glicerosfosfatídicos complexos associados à ósides e à inosital.

Infelizmente o trabalho de FAURE não teve a repercussão que merecia. O mundo mergulhava, nação por nação, na Segunda Guerra Mundial e a pesquisadora francesa paralizou suas pesquisas sobre os antígenos do "bacilo da tuberculina".

Nos Estados Unidos PANGBORN se empenhava no isolamento dos fosfolipídeos do coração de boi.

No mesmo ano que FAURE publicava seu trabalho, em ALBANY, MAL TANER E. examinava pouco mais de 40 soros de lepra enviados da Jamaica, utilizando-se do extrato aquoso do bacilo da tuberculose.

Até 1949 PANGBORN se ocupou dos fosfatídeos do coração de boi; isolada a cardioplipina, aperfeiçoou sua extração e apresentou métodos mais simples para o isolamento da lecitina. No entanto já em 1949 PANGBORN voltava-se para os antígenos do bacilo da tuberculose. Apontava então a dificuldade exis-

tente na reprodução de antígenos satisfatórios; tentando reproduzir o preparado de ANDERSON (1927) verificou que o nitrogênio e fósforo variavam de partida para partida; se o elemento responsável pela reação de fixação de complemento fosse um fosfatídeo complexo, era de se esperar que seu sal de bário pudesse fornecer um antígeno mais puro. Realmente os antígenos assim preparados reagem com soro de cavalo imunizado com tuberculose, porém não com soro humano tuberculoso.

O fracionamento do extrato aquoso do bacilo da tuberculose foi feito por PADRON (1952) ; dois componentes foram encontrados: um reagindo com soro imune de cavalo e outro fixando complemento em presença de soro humano. Este comportamento não era estranho àqueles que conheciam o trabalho de ILLAND (1951) que demonstrou a diferença de resposta à imunização tuberculosa, segundo à espécie do animal inoculado.

Tentativas de fracionar o antígeno aquoso, para reproduzir em forma de solução, não tiveram resultados; entretanto 8 partidas de antígenos preparadas durante o ano de 1953 puderam ser comparadas em atividade antigênica, porém não eram sensivelmente melhores que o primitivo antígeno preparado por simples ebulição dos bacilos em água destilada.

Esse antígeno aquoso purificado foi empregado por ALMEIDA, CARVALHO e PADRON (1956) em seu trabalho com soros de lepra e também por ALMEIDA, PEDREIRA DE FREITAS e BRANDÃO (1954) ao examinarem soros provenientes de doadores de sangue em S. PAULO.

Depois de longa série de experiências, PANGBORN, achou que um bom método de extração, consistia no tratamento dos bacilos lavados em acetona e secos, com uma mistura de álcool, água e éter. A precipitação do antígeno pela acetona permitia sua separação de misturas complexas. O precipitado em acetona, quando tratado pela piridina, dissolvia-se bem, a maior parte do antígeno, 60%, passando para a piridina. A solução em piridina continha todo o princípio antigênico do extrato original. Esse achado de PANGBORN fez com que se experimentasse o antígeno descrito por WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN, já em 1931, como solúvel em piridina e em benzeno. O antígeno solúvel em piridina era composto de lípidos e polissacarídeos; eram lipopolissacarídeos, contendo 2% de fósforo e açúcares não redutores; a reação do carbasol mostrava a presença da manose.

Assim em 1954, PANGBORN voltava ao ponto de partida assinalado por WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN 23 anos antes e chegava a um composto de atividade antigênica, de aparência gelatiniforme já descrito por FAURE em 1940.

O antígeno solúvel em piridina foi fracionado. O estudo dessas frações com soro de lepra permitiu o conhecimento das relações quantitativas entre os elementos da reação de fixação de complemento pelo "método das curvas de isofixação" de ALMEIDA (1956), levando o observador a refazer conceitos sobre os processos empregados em ALBANY, N. Y., com interpretação acertada de seus achados.

Analisando curvas de isofixação levantadas com soros de doentes de lepra, complemento e frações antigênicas separadas por método cromatográfico sobre ácido silícico, ALMEIDA, 1957-b e 1958, mostrou a complexidade das reações com lipopolissacarídeos de bacilos da tuberculose, contaminados com antígenos formadores de complexos imunes não dotados de capacidade fixadora do complemento.

O uso de sistemas modelos para a análise de resultados obtidos (ALMEIDA, 1956-c; THOMPSON e ALMEIDA, 1958), pôde mostrar a diversidade de comportamento entre os soros de lepra e de tuberculose em reações de fixação de complemento (ALMEIDA, 1957-b).

Antígenos não fixadores de complemento, verdadeiros "cripto-antígenos" em preparados de bacilo da tuberculose afetariam marcadamente a forma das curvas de isofixação. Os dados obtidos no "sistema lepra", projetados em

três coordenadas: antígeno, complemento e sôro, descreveriam "superfícies iso-hemolíticas" quando um mesmo ponto final de reação era escolhido (ALMEIDA, 1958).

O método de isofixação indicava as conseqüências possíveis no uso de diferentes doses de antígeno para a determinação dos títulos dos soros. A simplificação da técnica exigindo a aplicação dos fatores de conversão deu oportunidade para observar a influência da quantidade relativa de complemento fixado sobre a inclinação da função logística, e estabelecer os pontos de contato entre as técnicas adotadas em ALBANY e aquelas empregadas pelo grupo de Heidelberg.

Na comparação de antígenos utilizou-se o método seqüencial de análise de pares de resultados de maneira semelhante ao método empregado na padronização dos antígenos de cardiolipina e dos extratos alcoólicos de *Cisticercus cellulosae* (ALMEIDA MAGALHÃES, 1958).

O presente trabalho indica os métodos de preparo de antígenos extraídos de bacilo da tuberculose para reações com soros de lepra e inclui tabelas construídas para a aplicação de análise seqüencial de probabilidade direta na comparação de partidas de antígenos.

GENERALIDADES SÔBRE AS REAÇÕES QUANTITATIVAS DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO PELA TÉCNICA DE WADSWORTH, MALTANER E MALTANER. PRINCÍPIOS BÁSICOS. NOMENCLATURA EMPREGADA E MÉTODOS PARA ANÁLISE DAS CURVAS HEMOLÍTICAS.

As reações de fixação de complemento são traduzidas por diferenças nos graus de hemólises; essas diferenças refletem alterações da atividade hemolítica complementar, resultantes da presença de um complexo antígeno-anticorpo.

As mudanças da atividade complementar são evidenciadas pelo uso de métodos precisos de dosagem do complemento.

A unidade de complemento é a quantidade de sôro de cobaia necessária à hemólise de 50%. Comparando o número de unidades de complemento necessários para 50% de hemólise quando sôro e antígeno estão presentes, verificaram WADSWORTH, MALTANER e MALTANER que havia uma proporção direta entre complemento e sôro.

Um considerável excesso de sôro não impede a reação de fixação do complemento, mas antígeno em excesso pode diminuir sensivelmente a intensidade da reação. Muitas vezes então, necessário se torna ajustar a quantidade de antígeno a ser empregada na reação, a fim de se obter uma intensidade máxima na fixação do complemento. Ora, a quantidade de complemento a ser empregada no teste varia de acordo com a quantidade do complexo antígeno-anticorpo formado. Devido a essa interrelação, as quantidades de antígeno, sôro e complemento, devem ser proporcionais, de forma a permitir não se uma fixação máxima, como também deixar aproximadamente uma unidade de complemento livre.

As relações lineares entre sôro e complemento, de uma parte, e as encontradas entre antígeno e complemento de outra, simplificam o ajuste dos elementos da reação.

O método pode ser considerado tridimensional, pois variamos ao mesmo tempo sôro, antígeno e complemento. A representação gráfica de tal reação seria um sólido. Tal sistema tem recebido críticas severas de muitos sorologistas, porém como veremos no estudo do sistema lepra, há realmente necessidade desse ajuste para que se possa ter uma medida quantitativa da capacidade fixadora específica do sôro leproso.

Desde que conheçamos a relação entre complemento e antígeno, por experimentação com soros de diferentes positivities, podemos organizar um teste preliminar para a exclusão dos soros negativos. Sôro a examinar é posto em contacto com uma dose de antígeno capaz de dar reação máxima com soros fracamente positivos; a quantidade de complemento a ser usado no teste depende das condições em que a reação é feita. Quando a incubação preliminar é a 37°C, soluções diluídas de complemento deterioram-se, exigindo uma correção

da unidade de complemento; em geladeira, a deterioração é desprezível, não sendo necessária qualquer correção. A quantidade de complemento a ser usada num teste preliminar para exclusão de negativos é achada experimentalmente. Em vários sistemas estudados pela técnica de WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, três unidades de complemento têm sido empregadas no teste preliminar.

Simplificações têm sido propostas para a técnica quantitativa de MALTANER; uma delas utiliza-se de dose única de antígeno, seis unidades de complemento e faz variar o soro; a reatividade do soro é calculada na base da diluição capaz de dar 50% de hemólise, quando 6 unidades de complemento estão presentes. O método adotado nos serviços de rotina de sífilis em ALBANY foi proposto por MALTANER e GNESH (1948).

Esse método traz graves erros, pois soros de diferentes títulos, podem, numa mesma diluição, dar o mesmo grau de hemólise, sendo mantidos constantes o complemento e o antígeno. Basta que a linha de regressão soro-complemento tenha diferente inclinação. O método não pode ser recomendado em sistemas como lepra, em que a proporção entre complemento e soro é observada somente quando se computam os acréscimos em fixação em relação aos volumes de soro empregados.

A medida da reação de fixação do complemento é feita segundo circunstâncias da própria reação ou método. Alguns autores dão o título do soro em termos da diluição capaz de dar um determinado grau de inibição da hemólise; outros como CALMETTE e MASSOL (1909) determinam a reatividade do soro pelo consumo de complemento.

WADSWORTH, MALTANER e MALTANER (1931) utilizaram ambos os critérios: diversas quantidades de soro são postas a reagir com quantidades apropriadas de antígeno e doses variadas de complemento. O título do soro é baseado no número de unidades de complemento que seriam necessárias para 50% de hemólise se soro não diluído fôsse empregado com a dose ótima de antígeno.

É feita a dosagem de complemento, como primeiro passo; a unidade de complemento é aquela quantidade que determina 50% de hemólise nas condições do teste que são mantidas constantes: temperatura, volume dos reagentes (total), quantidade de hemácias sensibilizadas, tempo de hemólise.

Baseados nos resultados obtidos por BROOKS (1920), WADSWORTH, MALTANER e MALTANER propuseram-se a determinar as mudanças que ocorrem na atividade do complemento, nas reações de fixação. BROOKS mediu somente pequenas variações de complemento produzidas por luz ultra-violeta; ficou evidente que maior precisão poderia ser obtida comparando as quantidades de complemento capazes de produzir 50% de hemólise.

Na reação de fixação, após incubação com soro imune e antígeno, um maior volume de complemento é necessário para hemólise de 60%; na técnica de ALBANY os títulos se referem sempre ao complemento que juntado à reação, ainda deixa depois da fixação uma unidade livre.

Comparando as mudanças produzidas no complemento por várias quantidades de antígeno e de soro-imune e projetando as curvas hemolíticas obtidas, as seguintes relações puderam ser achadas:

1.º — A mudança na atividade do complemento (ou a quantidade de complemento fixado) é diretamente proporcional à quantidade de antígeno presente, desde que um definido excesso de soro-imune seja usado.

2.º — A mudança na atividade do complemento é diretamente proporcional à quantidade de soro-imune usado, desde que uma quantidade de antígeno (dose ótima) capaz de dar uma reação máxima, seja empregada.

3.º — Uma relação constante existe entre a quantidade de antígeno, na presença de um excesso de soro-imune e a quantidade de soro-imune na presença de um excesso de antígeno que produzem a mesma mudança na atividade do complemento.

Essas relações servem de base para as reações quantitativas de fixação de complemento, segundo a técnica de W. M. M.; as mudanças na atividade do complemento são indicadas em unidades 5010; nos Gráficos 1 e 2 êsses valores estão no eixo das ordenadas; em abscissas, as quantidades de antígeno ou de sôro empregado (em ml).

Para contrôlo da reação, dosagens de complemento são feitas em presença de antígeno ou de sôro, para o conhecimento da atividade anticomplementar dêsses elementos. Dosagens de complemento foram praticadas com misturas de sôro e antígeno, determinando-se diretamente qual a quantidade necessária para 50% de hemólise, para diferentes diluições de sôro.

O número de unidades de complemento necessárias para hemólise de 50% projetado contra os volumes de sôro empregados determinava pontos sobre uma reta. O conhecimento da relação linear entre sôro e complemento permitia calcular qual seria o número de unidades de complemento necessárias para 50% de hemólise, com 0,05 ml de sôro.

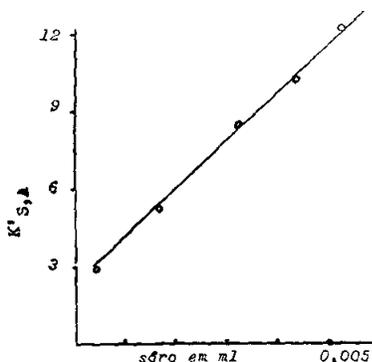


Gráfico 1. Relação sôro-complemento. Dosagem em presença de dose ótima de antígeno.

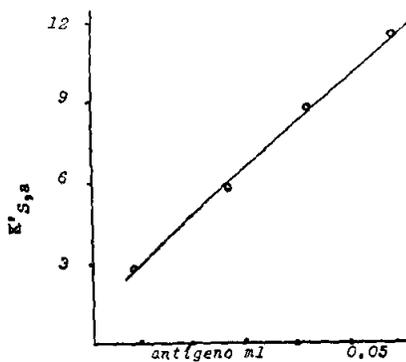


Gráfico 2. Relação antígeno-complemento. Dosagem em presença de excesso de sôro.

Uma reação com tal técnica seria impraticável em serviços de saúde pública. Se fosse conhecido o valor médio da constante h da equação que relaciona hemólise com complemento, astaria um tubo com hemólise parcial, para que

o número de unidades de complemento necessárias para 50% de hemólise pudesse ser calculado. Na prática seria a dosagem de complemento, com um único tubo.

Determinaram-se experimentalmente quais as modificações das curvas hemolíticas, por efeito do sôro, antígeno, complexos imunes, temperatura de incubação, período de hemólise, para diferentes sistemas de fixação do complemento.

As mudanças ocorridas na forma das curvas hemolíticas traduzidas em valores paramétricos, foram constantes para um mesmo sistema.

O conhecimento das constantes paramétricas da linha de regressão, traçada como uma curva sigmóide transformada, permitiu o levantamento de tabelas que tornaram prático o teste quantitativo.

Em trabalho anterior (ALMEIDA, 1950) mostramos, com exemplos, que as curvas sigmóides de resposta, obtidas nas dosagens de complemento, podiam ser expressas em outros sistemas de coordenadas e mencionamos dois mais comumente usados: o probítico e o logístico.

Na base de concordância dos resultados experimentais com os valores calculados, ambos os sistemas de coordenadas permitem a retificação da curva sigmóide obtida quando se projetam quantidades de complemento contra hemólises; é impossível dizer qual dos dois sistemas serve melhor ao uso nas dosagens de complemento.

Os probitos foram usados por IPSEN (1941) em seus estudos sôbre lisinas bacterianas, empregando "pesos" para melhor seguir a linha de regressão, de acôrdo com a hemólise observada. Na opinião de THOMPSON (1948) o sistema de pesos é usado para casos em que o número de indivíduos é relativamente pequeno (20 ou menos) e toma em consideração sómente a suposta fonte de êrro, a variação biológica na resistência individual ao agente em questão e o êrro da amostra usando êsse número de indivíduos; êsse sistema não é apropriado para o caso em que o número de indivíduos é grande, como por exemplo, nos testes de fixação de complemento quantitativa, em que o número de hemácias é de cem milhões ou mais em cada tubo.

VON KROGH foi o pioneiro no uso de transformação de dados experimentais de bioensaios. Seu trabalho sôbre hemólise hoje é clássico e utilizado largamente para a determinação da quantidade de complemento necessária para um estipulado grau de hemólise.

No presente trabalho usamos a função logística de VON KROGH que na sua forma logarítmica é a seguinte:

$$\log x = \log K + h \log \left(\frac{y}{1-y} \right)$$

onde x = complemento e y = hemólise; K e h são parâmetros.

Ao se fazer a reação de fixação de complemento, praticamos uma dosagem de complemento em presença do complexo fixador, depois de um período de incubação preliminar. Nesse caso, medimos hemólises resultantes do complemento residual C sôbre as hemácias sensibilizadas. A curva hemolítica, nessas condições, é ainda uma sigmóide e a função logística é empregada para traduzir os dados experimentais. Então podemos considerar dois métodos de análise dos resultados obtidos:

1.º MÉTODO: — A curva hemolítica é traçada projetando os dados no sistema de ordenadas: $\log x'$ e logitos de y . Os pontos caem numa linha reta na qual se pode determinar qual a quantidade de complemento x' que seria necessária a ser empregada na reação para que a hemólise fôsse de 50%. Por definição $x' = K'$.

Essa linha de regressão tem uma inclinação que é igual:

$$h' = \frac{\Delta \log x'}{\Delta \log \text{ito } y}$$

Êsse é o método utilizado por W. M. M. em seus estudos sôbre as reações quantitativas de fixação do complemento, onde sempre se procura determinar qual seria a quantidade de complemento necessária a uma determinada reação, para que, depois da fixação, sobrasse uma unidade livre de complemento.

2.º *MÉTODO*: — Depois da incubação preliminar onde complemento, antígeno e sôro estão presentes, determina-se a quantidade de complemento deixada livre. A curva sigmóide é retificada por projeção no sistema de coordenadas: log de V' e logitos de hemólise. V' significa volume da mistura; a inclinação da reta é dada pela expressão:

$$h' = \frac{\Delta \log V'}{\Delta \log \text{ito } y}$$

Êsse é o método utilizado por MAYER ET AL (1948) e recentemente empregado por BIER, SIQUEIRA e FURLANETTO (1955) em seus estudos sôbre a reação quantitativa entre cardiolipina e sôro sifilítico. Em determinadas condições h'_x pode ser igual à $h'_{V'}$, como mostraremos ao tratarmos dos fatôres de conversão para o sistema lepra.

A nomenclatura uniforme proposta por THOMPSON et al. em 1949, foi adotada neste trabalho, tanto para traduzir as condições da reação, como para nomear os vários elementos do sistema de fixação do complemento.

As diferentes condições em que o teste é feito, modos diversos como se alinham os elementos da reação tornam necessária a adoção de símbolos claramente definidos. As discussões dos resultados poderão ser feitas sem a necessidade de a cada passo definir os conceitos, que então se repetiriam por todo o texto dêste trabalho.

Introduzimos, por necessidade de exposição das condições em que a reação é praticada, algumas expressões, definidas como se seguem:

$K'S_a = K'$ quando sôro está em excesso na mistura da reação.

$K'S_A = K'$ quando o antígeno está em excesso, em relação à quantidade de sôro usada.

O parâmetro h' toma igual designação, para significar se sôro ou antígeno estão em excesso: h'_{S_a} e h'_{S_A} .

$K'S_A = K'$ quando sôro e antígeno estão em equivalência; nessas condições a quantidade de complemento fixada é máxima. Tal valor corresponde a $K'S_A$ como definido em WADSWORTH (1947).

PREPARO DE ANTÍGENOS DO BACILO DA TUBERCULOSE. ANTÍGENOS AQUOSOS PRECIPITADOS; TÉCNICA DE PREPARO. O ANTÍGENO SOLÚVEL EM PIRIDINA; FRACIONAMENTO. PROPRIEDADES GERAIS DOS ANTÍGENOS.

Os antígenos do bacilo da tuberculose aqui estudados foram preparados por dois métodos: o primeiro faz a extração dos bacilos com água fervente, enquanto o segundo o faz com uma mistura de água-éter-álcool, a frio. O primeiro método é empregado no preparo do antígeno aquoso precipitado; o segundo nos fornece o material que será solubilizado pela piridina.

ANTÍGENO AQUOSO PRECIPITADO

O antígeno aquoso precipitado é, de acordo com PADRON, preparado a quente, com a seguinte técnica:

1.º — Dois gramas de bacilos secos, previamente tratados pela acetona, são extraídos com 100 ml de água destilada. Levar à ebulição, mantendo a suspensão em agitação, por meio de um rotor elétrico. Deixar extrair por 90 minutos.

2.º — Centrifugar a quente a 3000 rpm durante 30 minutos, em copos de 250 ml.

3.º — Colher o sobrenadante e ressuspender as células em outros 100 ml de água destilada; repetir o processo de extração, combinando os dois sobrenadantes. Esse é o extrato total bruto.

4.º — Esfriar o extrato, deixando em geladeira por toda a noite. Ajustar o pH a $4,0 \pm 0,1$, com ácido acético 5 M; levar de novo à geladeira. Se não houver precipitado, juntar 1,0 ml da solução a 1% de cloreto de sódio. Deixar precipitar no frio. Centrifugar em centrifugador refrigerado a 3°C. Desprezar o sobrenadante.

5.º — Dissolver o precipitado em 20 ml de água destilada, ajustando-se o pH a 7,2 com NaOH n/1. A solução turva encerra todos os antígenos do extrato bruto.

6.º — Ajustar o pH a 8,5 e juntar 2/3 do seu volume da mistura clorofórmio-butanol (5:1), em funil separador de 150 ml (modelo SQUIBB). Agitar por 10 minutos. Centrifugar o funil por 40 minutos a 3000 rpm (suporte INTERNATIONAL n.º 392). Colher a camada aquosa em outro funil e repetir o tratamento com a solução clorofórmio-butanol, na proporção de 1/5 do seu volume.

7. — Combinar as camadas aquosas que contém clorofórmio emulsionado e butanol dissolvido, além de corpos bacilares e material insolúvel. Centrifugar a 5000 rpm em SERVALL durante 1 hora. Colher- o sobrenadante.

8.º — As camadas de clorofórmio são combinadas, ajustar o pH a 8,5 antes de agitar por 10 minutos com água destilada alcalinizada ao mesmo pH, em volume igual à metade da solução clorofórmica. Centrifugar. Fazer duas extrações com água, combinando os extratos aquosos que então são concentrados em vácuo, em corrente de CO₂. O extrato aquoso concentrado e então misturado ao sobrenadante aquoso, descrito em 7.º.

9.º — As frações aquosas combinadas são dializadas contra água destilada por toda a noite, com constante agitação.

10.º — O antígeno aquoso dializado é então liofilizado e o pó resultante é tratado por uma mistura de álcool-éter (1:1); agitar por uma hora, em funil e centrifugar, em tubo.

11.º — O pó seco obtido depois do tratamento álcool-éter é tratado com água destilada a quente. A solução resultante opalescente contém ainda material insolúvel que é retirado por centrifugação.

12.º — Juntar mertiolato para uma concentração final de 1 :10.000. A solução é o antígeno aquoso precipitado que reage com soro de lepra e de tuberculose (humana), mas não com soro imune de cavalo.

13.º — A parte solúvel em álcool-éter, quando tratada pela água e dializada, para remoção dos solventes orgânicos dá uma solução também opalescente que reage com soro de cavalo imunizado à tuberculose, mas não fixa complemento com Miro humano de lepra ou de tuberculose.

ANTÍGENO SOLÚVEL EM PIRIDINA

A observação de que os antígenos do bacilo da tuberculose eram solúveis em piridina se deve a WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN (1931), que extraíram os bacilos secos em álcool etílico a quente; os bacilos eram retomados em

piridina em SOXHLET; o extrato piridínico era sêco e o resíduo dissolvido em benzeno, depois do tratamento com acetona a quente.

A parte insolúvel em acetona e solúvel em benzeno é lecitinada. O antígeno de W. K. K. é evaporado e suspenso em solução fisiológica, logo antes de usar.

PANGBORN (1955) verificou que ao se fazer a suspensão salina do antígeno de W. K. K. uma parte ficava insolúvel e na base do rendimento em antígeno, selecionou um método para preparar o antígeno solúvel em piridina. Êsse antígeno, chamado em nosso trabalho de H-A5 é feito de acôrdo com a seguinte técnica:

1.^o — *Bacilos secos em acetona, são extraídos a frio com uma mistura de álcool-água e éter (1:1:0,6), com freqüente agitação, por uma hora.*

2.^o — *Centrifugar. Colhêr o sobrenadante. Os bacilos são re-extraídos, depois abandonados. Os sobrenadastes são combinados e concentrados por destilação a vácuo. A solução fortemente opalescente é tratada por parte igual de acetona e solução hipertônica de cloreto de sódio, para isotonsar.*

3.^o — *Deixar em geladeira por uma noite. O precipitado é colhido por centrifugação e lavado várias vêzes em acetona, antes de secar.*

4.^o — *Dissolver o precipitado sêco em água destilada, a quente. Centrifugar em SERVALL, a 5000 rpm por uma hora. Desprezar o sedimento.*

5.^o — *O sobrenadante é re-precipitado com acetona e cloreto de cálcio, como prèviamente. Secar o precipitado, lavando-o várias vêzes em acetona. O precipitado sêco é então extraído com piridina em temperatura ambiente por 24 horas, com agitação freqüente.*

6.^o — *A parte solúvel em piridina representa 60% em peso do precipitado e tem tôda a atividade antigênica do extrato original.*

7.^o — *Evaporar a piridina por destilação a vácuo. O pó resultante é dissolvido em água destilada na proporção de 0,1 g para 100 ml de água. Isotonisar com cloreto de sódio. Êsse é o antígeno designado por PANGBORN como HA-5.*

PROPRIEDADES GERAIS DOS ANTÍGENOS

O antígeno aquoso precipitado é bastante impuro, contendo proteínas desnaturadas, ácidos nucléicos e grande quantidade de carboidratos associados a fosfolipídeos. Sua solubilidade em água, a presença constante de polissacarídeos, sugerem que a atividade antigênica esteja relacionada com asses compostos, uma vez que a parte lipídica não reagia com o sôro humano de tuberculose. Um dos fosfatídeos que reage com o sôro de cavalo, quando associado à lecitina e colesterol, fixa complemento com sôro sífilítico, de maneira idêntica à cardioliipina, da qual não pode ser diferenciado sorolôgicamente (PANGBORN, 1952).

O extrato aquoso preparado pela técnica de PADRON parece conter o antígeno ligado à uma cadeia lipídica que lhe confere solubilidade nos solventes orgânicos. Êsse complexo pode ser decomposto por tratamento com álcool metílico, mas as tentativas feitas para o isolamento do antígeno não foram felizes.

Em resumo, o princípio antigênico do extrato aquoso é resistente ao calor (100°C), insolúvel na acetona e no álcool a 96° G. L., solúvel na piridina, não precipitável pela mistura álcool butílico-clorofórmio; solúvel na mistura aquosa, depois do tratamento com álcool-éter, não é dialisável. Reação ao carbasol positiva (polissacarídeos). Em eletroforese apresenta quatro componentes: o primeiro corresponde a 20% do total com mobilidade igual a 17,5; o segundo, 40% do total, com mobilidade de 8,76; o terceiro, corresponde a 16% do antígeno total, com mobilidade de 3,75; o quarto componente, 24% da mistura, com muito baixa mobilidade para ser medida. A mobilidade é dada em têrmos de 10^{-5} cm² volt⁻¹seg⁻¹. em 0,1 N de solução fosfatada tampão de p11=7,7.

O antígeno solúvel em piridina pôde ser fracionado pelo metanol. A parte solúvel contém praticamente tôda a atividade antigênica do antígeno de piridina; essa fração contém aproximadamente 1,77% de nitrogênio, 45% de manose e perto de 50% de ácidos graxos. Reação de MOLISH negativa, mas dá uma característica côr marrom (da manose) com o carbasol.

Quando a solução em metanol é seca e tratada pela água, toma um aspecto de gelatina incolor, com um leve tom fluorescente azulado, sob a luz de WOOD. Quando se junta cloreto de sódio, aparece uma turvação, porém não precipitação.

Essa fração seria um lipopolissacarídeo e provavelmente é o mesmo isolado por FAURE em 1940, por métodos diferentes.

Outra fração isolada do extrato solúvel em piridina contém 05% de fósforo e 0,9% de nitrogênio; é precipitada pelo metanol e apresenta-se com grande turvação em solução aquosa; não contém açúcares e é provavelmente composta de lípidos.

As frações solúveis em piridina, metanol e acetona, apresentam reação de MOLISH negativa, carbasol positiva com aparência não característica. Um dos fosfolipídeos isolados dessa mistura reage com soro sífilítico, quando em mistura alcoólica com lecitina e colesterol. Outro componente encontrado muito se assemelha a uma cera, inativa sorològicamente (PANGBORN e ALMEIDA, 1955).

OS ELEMENTOS DA REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO. HEMÁCIAS DE CARNEIRO. HEMOLISINA. COMPLEMENTO.

HEMÁCIAS DE CARNEIRO

Selecionar carneiros que apresentem índice de fragilidade globular normal. O sangue é colhido em solução citratada e glucosada de ALSEVER, segundo BUKANTS, REIN e KENT (1946) e mantido por uma semana em geladeira para a estabilização da resistência globular.

Na ocasião de ser usado, o sangue é centrifugado; desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em solução fisiológica. Centrifugar de novo e repetir o processo de lavagem até que o sobrenadante se apresente isento de albumina.

Utilizar, para a reação, pelo menos três diferentes sangues; misturar os sedimentos depois de lavados, evitando-se a sensibilização de hemácias por isoaglutininas.

Preparar a suspensão a 5% juntando a quantidade necessária de solução salina. Aferir a suspensão em fotômetro onda de 545 m_{μ} (filtro verde-amarelo) (ALMEIDA, 1950) ; a solução de 0,1 ml da suspensão em 1,4 ml de água destilada deve ter uma densidade ótica igual a $0,50 \pm 0,01$.

HEMOLISINA

Inocular coelhos selecionados (por possuírem amboceptores naturais anti-carneiro) com hemácias e soro de carneiro, segundo o método de ULRICHMACARTHUR (1942).

Ao soro do coelho imunizado juntar parte igual de glicerina quimicamente pura. Neste trabalho, hemolisina significa soro-hemolítico glicerinado.

Para sua dosagem, a hemolisina é diluída e as soluções são experimentadas na sensibilização de hemácias padronizadas que então são incubadas a 37°C por 15 minutos, em banho-maria, em presença de quantidade constante de complemento.

A quantidade de complemento utilizada deve conter 1 unidade 50 por cento (aproximadamente 0,3 ml da solução a 1:200 de soro de cobaia).

As hemólises parciais obtidas com hemácias diversamente sensibilizada: permitem definir nessa dosagem duas zonas bastante nítidas. Na primeira a: hemólises crescem com a maior concentração de hemolisina usada; nesse caso a hemólise obtida depende do grau de sensibilização da hemácia; na segunda zona. os graus de hemólise são sensivelmente os mesmos, embora cada tubo contenha hemácias diferentemente sensibilizadas. O primeiro tubo, que é o limite entre a primeira e segunda zona, indica a concentração de hemolisina que produzia a sensibilização máxima dos glóbulos. Outras concentrações mais elevadas de

hemolisina não mais influem na hemólise. Os glóbulos se comportam como se estivessem saturados de hemolisina.

A dose ótima de hemolisina assim determinada é utilizada na sensibilização das hemácias para uso na reação. Hemácias praticamente saturadas são insensíveis a ulterior acréscimo de amboceptores hemolíticos, como os encontrados freqüentemente no soro humano. Nesse caso hemácias ótimamente sensibilizadas funcionam apenas como indicador de complemento livre e a hemólise independe da presença de hemolisina. Ora essa é a condição bastante e necessária para o indicador hemolítico funcionar para evidenciar complemento, segundo o grau de hemólise obtido.

COMPLEMENTO

Soros de cobaias (em média 30 cobaias, machos), de sangue colhido por punção cardíaca, são centrifugados, numerados e submetidos às provas individuais de atividade hemolítica.

A importância prática dessas provas foi demonstrada por GILBERT (1933), HAZEN e GREENSPAN (1936), GIORDANO e CARLSON (1939) e HARRIS (1941) em diversos sistemas e técnicas de fixação do complemento, quando ao lado da atividade hemolítica faziam a prova da reatividade do antígeno em presença do complemento, mas na ausência de anticorpo. Soros deficientes ou muito potentes em atividade hemolítica ou aqueles que se combinam com o antígeno, devem ser evitados. Os soros de cobaia de atividade normal são então misturados, distribuídos em pequenos volumes e mantidos congelados.

WADSWORTH, MALTANER e MALTANER (1931) definiram as capacidades hemolítica e de fixação, como propriedades distintas no complemento; não se poderia medir a capacidade de fixação do complemento pela sua atividade hemolítica. Em um determinado soro de cobaia a atividade hemolítica pode ser grande enquanto existe pouca fixabilidade. Quando se preserva complemento com soluções boratadas, mantém-se a capacidade hemolítica, mas o complemento vai perdendo sua fixabilidade. O uso da mistura de muitos soros de cobaia resulta da observação de que pode haver uma proporção estatística entre as duas propriedades, dando ao complemento um comportamento uniforme. Nessas condições pode-se determinar a fixação do complemento pelas mudanças ocorridas em sua capacidade hemolítica.

O complemento é dosado em presença de hemácias ótimamente sensibilizadas. Complemento, em diluição em salina é distribuído em diferentes quantidades (compreendendo de 0,00050 até 0,00250 ml de complemento não diluído) em tubos calibrados de 12 por 75 mm. Completar o volume para 0,3 ml com solução salina e acrescentar 0,2 ml de hemácias sensibilizadas. Após 15 minutos a 37°C, juntar aos tubos 1,0 ml de solução fisiológica gelada, agitar e centrifugar. Ler hemólise no sobrenadante, por meio do colorímetro foto-elétrico.

Em papel logito-logaritmo projetar os dados da dosagem: complemento (x) e hemólise (y), respectivamente logaritmos e logitos. Pelos pontos traçar uma reta que então determina na intersecção com a abscissa 50% de hemólise um ponto que projetado sobre o eixo das ordenadas, determina a quantidade de complemento necessário para 50%, de hemólise, ou seja a unidade, por definição.

A unidade de complemento normalmente vai de 0,00100 a 0,00175 ml, enquanto a inclinação da linha de regressão de sua dosagem tem um valor em redor de $0,2 \pm 0,02$.

Se o complemento dosado estiver dentro desses limites, soluções são preparadas contendo uma, duas, três, seis, nove e doze unidades em 0,1 ml. Feitas as soluções, faz-se um teste de prova com cada uma delas, para evidenciar qualquer possível erro nas diluições. Manter as soluções em galo fundente até usá-las.

As soluções de complemento são preparadas diariamente, assim como a suspensão de hemácias.

**REACÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM SÔRO DILUÍDO.
EFEITO DO DILUENTE SÔBRE O TÍTULO DO SÔRO.
AÇÃO DO CÁLCIO E MAGNÉSIO.**

SÔRO HUMANO

O sôro humano é empregado diluído ou não, na quantidade de 0,05 ml sendo que o volume total da reacção, antes de se juntar o indicador hemolítico, é de 0,3 ml e 0,5 ml depois.

Quando necessário o sôro é diluído. O diluente usado tem variado segundo as técnicas; sôro normal tem sido empregado na reacção de WASSERMANN quantitativa de W. M. M.; outros sistemas, como tuberculose, empregam solução salina boratada enquanto a escola de BIER recomenda o uso da solução tamponada de veronal, com quantidades apropriadas de cálcio e magnésio.

O sôro humano é inativado por aquecimento a 56°C durante meia hora, no dia em que a reacção é feita. O sôro é mantido estéril, distribuído em volumes de 1,0 ml em geladeira ou em congelador.

Quando o sôro se apresenta turvo pela presença de gorduras, costumamos filtrá-lo em SEITZ EK; o sôro límpido é então inativado.

As diluições são feitas em série aritmética, sempre a partir do sôro original. Procuramos trabalhar com concentrações de sôro que se diferenciam uma das outras por uma quantidade exata e constante.

DILUENTE

É quase sempre necessário diluir o sôro reagente de lepra, na sua forma lepromatosa, uma vez que os títulos são maiores que 10, na maior parte dos casos.

Sôro diluído é então experimentado com diferentes quantidades de antígeno e de complemento.

É de interêsse saber qual a influência exercida pelo diluente nas reacções de fixação de complemento em lepra.

Experimentamos de início a solução fisiológica tamponada com borato, comparando com sôro humano normal como diluente; em seguida comparamos a solução boratada com o tampão de veronal, com ou sem metais (cálcio e magnésio).

Os resultados são dados em títulos, definidos de acôrdo com a técnica de W. M. M., e determinados pelo Método I descrito em WADSWORTH (1947). O Quadro I mostra os resultados obtidos com solução salina boratada e sôro normal usados como diluentes do sôro de lepra.

As discrepâncias maiores que 16% definem "reacções defeituosas" segundo o conceito adotado para a avaliação e classificação de observações, em testes de análise seqüencial (THOMPSON, 1949).

Em série paralela de testes em duplicata THOMPSON e SILVERSTEIN (1954) encontraram apenas 1% de observações "defeituosas" em 300 pares de reacções, utilizando o mesmo diluente e o mesmo antígeno.

Os nossos dados sugerem ser o diluente o responsável pelo maior número de reacções defeituosas encontradas; não se observa nenhuma tendência para títulos mais altos, segundo o diluente empregado.

Sôro humano normal utilizado nessa série de experiências foi cuidadosamente selecionado de crianças, com menos de 5 anos de idade e com prova negativa à tuberculina. Todos os soros foram antes experimentados com 3 unidades de complemento e com dose ótima de antígeno. Somente foram utilizados soros que em 10 minutos de incubação a 37°C mostraram hemólise total. A incubação preliminar foi de 90 minutos a 37°C.

De sessenta soros examinados 48 mostraram hemólise total em 10 minutos e os restantes em 15 minutos a 37°C. Nenhum dos soros reagiu na prova qualitativa de fixação de complemento com o antígeno HA-5 lecitinado a 0,05%.

QUADRO I

TÍTULOS DE SOROS DE LEPTA LEPROMATOSA DETERMINADOS POR REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO QUANTITATIVA E DILUÍDOS EM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA BORATADA OU SORO HUMANO NORMAL.

Sôro n.º	Sol. boratada	Sôro normal	Discrepância achada
575	24	25	4,1%
936	28	28	0 %
536	12	14	15,3%
1019	26	22	16,7%
105	48	48	0 %
1066	80	86	7,2%
1200	37	35	5,5%
4965	434	446	2,7%
649	33	47	21,2%
499	11	12	9,5%
1008	160	148	7,8%
1051	19	15	23,6%
1065	325	340	4,5%
576	272	290	6,4%
1227	420	420	0 %
99	780	710	9,4%

OBSERVAÇÃO: antígeno usado: HA-5 lecitinado a 0,005%. Sôro normal: mistura de soros de crianças de 2 a 5 anos de idade, tuberculino negativas (Mantoux a 1:10).

A solução fisiológica boratada é preparada diluindo um volume da solução tampão de borato em nove volumes de solução a 8,5 g % de cloreto de sódio. A solução tampão de borato é preparada tomando 6,2 g de ácido bórico em um copo com 52,5 ml de soda normal. Dissolver e passar para um balão volumétrico de um litro; juntar 47,5 ml de ácido clorídrico normal. Completar o volume com água destilada. Distribuir e autoclavar por 30 minutos a 115 libras de pressão.

A solução salina de veronal foi preparada diluindo 85,0 g de cloreto de sódio, 5,75 g de ácido 5-5-dietil-barbitúrico e 3,75 g de 5-5-dietilbarbiturato de

sódio em 2 litros de água destilada. Ao usar, diluir uma parte dessa solução em 5 partes de água destilada. Juntar então cálcio e magnésio para as concentrações respectivas de 0,0015 M e 0,0005 M.

O efeito do magnésio em salina tamponada com veronal foi estudado por MAYER ET AL. (1946) que concluíram dever ser recomendado seu uso nas reações de fixação de complemento. O complemento se mostrava mais ativo com magnésio que com solução fisiológica.

MALTANER e ALMEIDA (1948) mostraram que o efeito ativante do magnésio era inibido pelo soro humano inativado quando usado nas proporções empregadas por W. M. M.; êsse antagonismo, soro-magnésio produzia distorção nos títulos dos soros sífilíticos testados pela técnica de ALBANY; tal mudança na reatividade do soro podia ser corrigida introduzindo no cálculo do título o controle do soro.

Em uma série de trabalhos LEVINE ET AL (1953, 1954) estudaram o papel desempenhado pelo cálcio ionizado na fixação do complemento e concluíram ser êsse elemento essencial à reação. O cálcio seria necessário à união do complemento ao complexo antígeno-anticorpo, ao passo que o magnésio agiria, por mecanismo desconhecido, sobre a ativação da hemólise; êsses dois metais seriam indispensáveis iônicos nas reações de fixação do complemento.

Estudando o efeito da diluição do soro de lepra com salina-veronal, com cálcio e magnésio, em comparação com a titulação feita com diluições em salina boratada, verificamos pronunciada alteração na reação quanto à quantidade de soro capaz de dar, em presença do antígeno, 50% de hemólise com 6 ou 12 unidades de complemento. Os testes foram feitos ao mesmo tempo.

Observamos que quando soro inativado está presente, a ação ativante do magnésio é inibida. Os Protocolos I e II mostram que se considerarmos as duas reações com o mesmo valor absoluto da unidade de complemento (em termos de soro de cobaia) os títulos são os mesmos, quer em salina boratada, quer em salina-veronal com metais, pois 1,65 unidades veronal equivalem a uma unidade salina-boratada.

As inclinações das linhas de regressão soro-complemento são iguais e portanto os títulos por acréscimo são os mesmos. Se aplicarmos o Método I (WADSWORTH, 1947) para a titulação dêsse soro diluído em salina boratada ou em veronal com cálcio e magnésio, verificaremos que o título do soro não variou, corrigida a unidade de complemento com o controle do soro (MALTANER e ALMEIDA, 1948).

Como cálcio e magnésio são necessários à fixação do complemento e à hemólise, a experiência sugere que existe no soro humano quantidades apropriadas desses elementos.

Na técnica quantitativa de W. M. M. a quantidade de soro é relativamente grande em comparação com os outros elementos, pois empregamos 0,05 ml de soro para um volume total de reação igual a 0,3. Se a diluição do soro é feita com soro humano normal, não haverá razões para suplementar com Ca^{++} e MG^{++} o teor asses iônicos presentes na reação.

Consideramos portanto desnecessário na técnica que adotamos o uso da solução tamponada de veronal, com Ca^{++} e MG^{++} pois usamos diluir o soro leproso em soro normal. Os outros elementos da reação são diluídos em salina boratada.

OBSERVAÇÃO: — Os Protocolos I e II mostram reações praticadas com diferentes doses de antígeno. Como veremos mais adiante, os títulos por acréscimo não são afetados por excesso de antígeno. A comparação dos títulos se deve fazer depois de corrigir a unidade para um dos sistemas: veronal— Ca^{++} — MG^{++} ou salina boratada.

REAÇÕES COM OS ELEMENTOS DILUÍDOS EM SOLUÇÃO SALINA BORATADA

SÓRO DE LEPRA N.º 22455	ANTÍGENO H-A5 LECITINADO A 0,05% (ml)					
	0,020	0,015	0,010	0,005	0,020	0,010
					0,015	0,005
	UNIDADES DE COMPLEMENTO					
	6					
	12					
ml	HEMÓLISE %					
0,030	0	0	0	0	50	35
0,020	0	0	0	0	100	100
0,015	45	10	10	0		
0,010	100	95	85	80		
0,008	100	100	100	100		

CONTRÓLES

DO ANTÍGENO COM 2 UNIDADES DE COMPLEMENTO	75	80	90	95
---	----	----	----	----

DO SÓRO, COM UNIDADES DE COMPLEMENTO	DO COMPLEMENTO COM:	DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U
40	90	100
		1 U
		2 U
		50
		100
		0

Temperatura de incubação 37°; tempo 90 minutos; hemólise em 15 minutos.

OBSERVAÇÃO: Todos os elementos da reação foram diluídos com solução salina boratada; o mesmo diluente foi utilizado para completar o volume de 1,5 ml necessário à leitura da hemólise em espectrofotômetro.

PROTOCOLO II

REAÇÕES COM OS ELEMENTOS DILUÍDOS EM SALINA-VERONAL COM Ca + + + + + +
e Mg

SÔRO DE LEPRA N.º 22455	ANTÍGENO HA-5 LECITINADO A 0,05% (ml)						
	0,020	0,015	0,010	0,005	0,020	0,015	0,010
UNIDADES DE COMPLEMENTO							
6							
HEMÓLISE %							
0,015	0	0	0	0	70	35	10
0,010	0	0	0	0	100	90	90
0,008	0	0	0	0	100	100	75
0,006	20	30	10	0	100	100	100
0,004	100	100	80	35			
0,002	100	100	100	100			

CONTROLES

DO ANTÍGENO COM 2 U. DE COMPLEMENTO	80	80	95	95
---	----	----	----	----

DO SÔRO, COM UNIDADES DE COMPLEMENTO	DO COMPLEMENTO COM:	DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS			
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	0%
5	55	85	55	100	

Temperatura de incubação 37°C; tempo 90 minutos; hemólise em 15 minutos.

OBSERVAÇÃO: Todos os elementos da reação foram diluídos com solução salina tampão-veronal, com magnésio e cálcio; o mesmo diluente foi utilizado para completar o volume de 1,5 ml necessário à leitura da hemólise em espectrofotômetro.

CÁLCULO DE TÍTULO

$$T = \frac{\Delta K'_{s,A} \cdot 0,05}{\Delta \text{SÔRO}}$$

De acordo com as hemólises parciais obtidas com 12 e 6 unidades de complemento, calculamos $K'_{s,A}$ para cada diluição de antígeno (TABELA II).

REAÇÕES COM SALINA-BORATADA

SÔRO	HEMÓLISE %		$K'_{s,A}$	Δ SÔRO	$\Delta K'_{s,A}$	TÍTULO
	6 U	12 U				
0,030		50	12			
0,015	45		6,2	0,015	5,8	19,3
0,030		25	15,5			
0,015	10		8,9	0,015	6,6	22,0
0,030		35	13,6			
0,010	85		4,9	0,020	8,7	21,8
0,030		35	13,6			
0,010	80		5,1	0,020	8,5	21,3
TÍTULO MÉDIO						21,1

REAÇÕES COM VERONAL — Ca++ Mg++

0,010		75	10,3			
0,004	35		6,5	0,006	3,8	31,7
0,010		90	9,0			
0,004	80		5,1	0,006	3,9	32,5
0,015		35	13,6			
0,006	30		6,7	0,009	6,9	38,3
0,010		70	10,6			
0,005	20		7,4	0,004	3,2	40,0
TÍTULO MÉDIO						35,6

Relação entre unidades de complemento determinadas com os dois diluentes, em presença de 0,05 ml de soro.

$$1 \text{ unidade salina} = 1,7 \text{ unidades veronal}$$

É de se esperar que sendo o título dado em número de unidades de complemento que o valor achado com veronal seja 1,7 vezes maior que o determinado tom salina. Realmente foi essa a relação encontrada:

$$35,6 / 21,1 = 1,7$$

CURVAS DE ISO-FIXAÇÃO COMO METODO DE ESTUDO DAS REAÇÕES QUANTITATIVAS DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO.

A REAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO-COMPLEMENTO

Quando estudamos um novo sistema de fixação do complemento, precisamos conhecer o tipo de reação, verificando a existência de possíveis efeitos zonais por excesso de antígeno.

Um método utilizado em tôdas as técnicas de fixação do complemento consiste em fazer reagir diferentes concentrações de antígeno com diversas diluições de sôro, a quantidade de complemento sendo mantida constante.

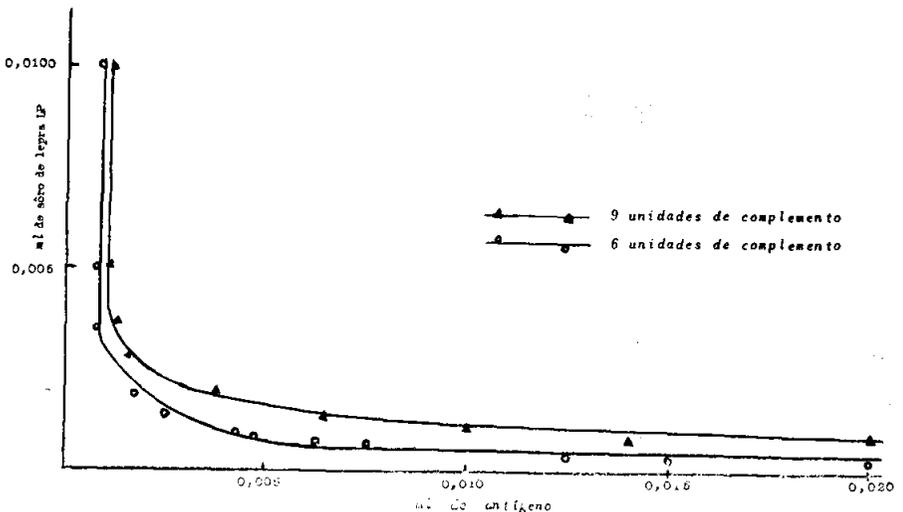
Em nosso trabalho também utilizamos esse método, dando porém diferente interpretação, projetando antígeno em abcissas contra sôro em ordenadas. As quantidades de um e outro são escolhidas como aquelas que reagindo formam complexos antígeno-anticorpo dotados da mesma capacidade de fixar complemento.

Se empregarmos, por exemplo, seis unidades de complemento, escolhemos as quantidades de sôro e de antígeno capazes de reagir com o complemento fixando 5 unidades. O ponto 50% de hemólise, por ser o mais preciso, deve ter preferência, embora se possa selecionar qualquer outro. A projeção determina pontos em uma curva que denominamos "curva de isofixação" pois em todos os seus pontos a fixação do complemento foi a mesma (ALMEIDA, 1956).

Podemos levantar outras curvas de isofixação para o sistema em estudo; os Gráficos 3 e 4 apresentam curvas de isofixação determinadas com várias unidades de complemento, traduzindo as relações quantitativas entre sôro e antígeno (Protocolos III e IV).

CRÁFICO 3

Curvas de isofixação com antígeno lecitinado e sôro de lepra nº LP (Protocolo III)



PROTOCOLO III

CURVAS DE ISOFIXAÇÃO EM LEPRO (GRÁFICO 3)

SÔRO LP DILUIÇÕES DE ANTÍGENO HA-5 LECITINADO A 0,005%										1:
ml	50	33	25	17	13	6,7	5,0	4,0	3,3	2,5
HEMÓLISE % COM 9 UNIDADES DE COMPLEMENTO										
0,0100	67	30	12	0	0	0	0	0	0	0
0,0050	70	27	10	0	0	0	0	0	0	0
0,0030	98	52	37	0	0	0	0	0	0	0
0,0020	100	100	100	70	45	0	0	0	0	0
0,0015	100	100	100	100	100	30	5	0	0	0
0,0010						100	85	60	25	0
0,0009								100	40	10
0,0008								100	60	25
0,0007									100	40
0,0006									100	55
0,0005									100	95

HEMÓLISE % COM 6 UNIDADES DE COMPLEMENTO										
0,0100	68	35	10	0						
0,0050	60	45	20	5	0					
0,0030	75	40	15	10	0					
0,0020	90	60	30	10	0					
0,0015	100	90	65	25	5	0				
0,0010			100	95	60	5	0			
0,0009				100	80	10	0			
0,0008				100	90	15	0			
0,0007					100	30	10	0		
0,0006					100	50	25	15	0	
0,0005					100	70	55	15	0	
0,0004					100	90	85	60	50	15
0,0003							100	95	75	60
0,0002									100	90

CONTROLES

DO ANTÍGENO COM 2 UNIDADES										
	85	85	90	90	90	95	90	95	95	95

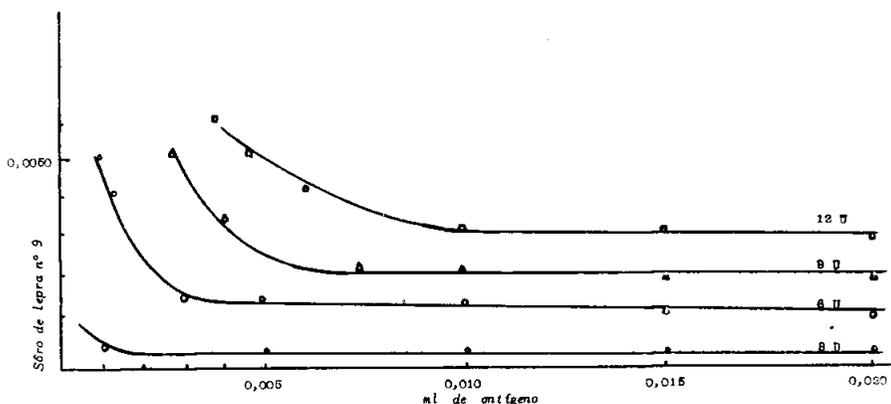
DO COMPLEMENTO COM:		DO SÔRO COM		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	1 U	2 U	
15%	90%	45%	100%	

Incubação preliminar: 37°C por 90 minutos
 Incubação de hemólise: 37°C por 15 minutos

GRÁFICO 4

Curva de isofixação com
excesso de antígeno.
(Protocolo IV)

SISTEMA LEPROA



Dessa forma dizer que a mistura sêro-antígeno fixou cinco unidades de complemento, quando seis estavam presentes não significa o conhecimento da reatividade do sêro ou do antígeno, pois pode depender significativamente da quantidade do outro componente presente; podemos dizer que a quantidade de complemento fixado é uma função das proporções relativas em que antígeno e anticorpo estão presentes na mistura.

A função de isofixação poderia ter a expressão:

$$Q = f(W, Z)$$

onde Q é a quantidade de complemento fixado pelo complexo imune formado pelo antígeno W e pelo anticorpo contido no sêro, Z.

Quando W torna-se muito grande em relação a Z, podemos esperar que

$$Q = f(Z)$$

Quando Z tende para zero, Q tende também para zero desde que W não seja anticomplementar.

Essa condição é encontrada, quando acréscimos significantes de antígeno não exigem o decréscimo correspondente da quantidade de sêro, para formar um complexo de isofixação. Nesse caso a fixação do complemento depende da quantidade de anticorpo presente, pois variações nas quantidades de antígeno não afetaram a reação. Assim os pontos de isofixação descrevem uma curva com uma parte assintótica ao eixo das abscissas.

Outras curvas de isofixação podem ser traçadas empregando diferentes quantidades de complemento. O Gráfico 4 nos mostra as curvas obtidas com três, seis, nove e doze unidades de complemento, com sêro de lepra e antígeno lecitinado HA-5.

PROTOCOLO IV

CURVAS DE ISOFIXAÇÃO COM EXCESSO DE ANTÍGENO (Gráfico 4)

SÔRO DE LEPRA N.º 9 ml	ml DE ANTÍGENO					
	0,020	0,015	0,010	0,005	0,003	0,001
	HEMÓLISE COM 3 UNIDADES DE COMPLEMENTO					
0,0015	0	0	0	0	0	10
0,0010	0	0	0	0	0	25
0,0005	35	35	30	35	35	55
0,0003	50	50	55	55	50	70

6 UNIDADES DE COMPLEMENTO						
0,0050	0	0	0	0	0	55
0,0040	0	0	0	0	5	80
0,0030	0	0	0	0	25	90
0,0025	5	5	5	10	28	100
0,0020	5	5	5	25	35	100
0,0015	35	35	65	80	90	100
0,0010	70	65	90	100	100	100

9 UNIDADES DE COMPLEMENTO						
0,0050	0	0	0	10	60	90
0,0040	0	0	10	30	90	100
0,0030	0	5	15	30	100	100
0,0025	5	10	30	70	100	100
0,0020	70	70	65	90	100	100
0,0015	80	80	80	90	100	100

12 UNIDADES DE COMPLEMENTO						
0,0060	0	0	0	15	85	100
0,0050	5	10	10	45	100	100
0,0040	25	25	25	40	90	100
0,0035	50	55	55	75	100	100
0,0030	60	70	85	90	100	100
0,0025	85	85	80	100	100	100

CONTROLES

DO ANTÍGENO, COM 2 UNIDADES DE COMPLEMENTO						
	80	85	90	100	100	100

DO COMPLEMENTO COM:		DO SÔRO COM:		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS:
1 U	2 U	1 U	2 U	
15%	90%	55%	100%	0%

Quando a reação se faz com 0,010 ml de antígeno ou mais, a fixação depende da quantidade de sôro presente:

$$Q = f(Z)$$

São essas as condições necessárias e suficientes para a determinação do título de um sôro, como o número de unidades de complemento necessárias a 50% de hemólise, quando sôro não diluído é empregado, com a dose apropriada de antígeno. Esse valor é achado por extrapolação à partir da reação observada com as diluições experimentadas.

Outra condição encontrada na curva de isofixação é mostrada pelo ramo vertical da curva. Nessa parte, o sôro (Z) torna-se muito grande em relação à quantidade de antígeno presente (W) e então:

$$Q = f(W)$$

Realmente a quantidade de complemento fixado depende da quantidade de antígeno presente, pois aumentos consideráveis de sôro pouco afetam a reatividade da mistura em que se forma o complexo imune com antígeno (W) e anticorpo expresso em termos de sôro Z.

No caso presente obtemos condições para que a quantidade de complemento fixado dependa da quantidade de antígeno presente, ou em outras palavras, o ramo vertical da curva de isofixação indica as condições nas quais a dosagem do antígeno deve ser feita.

O Gráfico 5 nos mostra duas curvas de isofixação; as quantidades de antígeno presentes na reação com excesso de sôro, quando projetadas contra as unidades de complemento fixado, descrevem pontos sobre uma reta. O título do antígeno pode ser calculado por extrapolação, como o número de unidades de complemento necessárias para hemólise de 50 por cento quando 0,1 ml de antígeno não diluído está presente, com grande excesso de anticorpo, segundo WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, 1938, ou de acôrdo com ALMEIDA, 1956.

A parte da curva de isofixação que liga as duas assíntotas é a zona em que a quantidade de complemento fixado depende tanto do antígeno como do anticorpo, sendo portanto impossível avaliar a reatividade de um ou outro em termos de complemento fixado. Essa zona limita condições indesejáveis nas reações de fixação do complemento, onde devemos ter apenas uma variável para ser determinada.

Na realidade a condição ideal de se fazer a dosagem apenas de um dos elementos, antígeno ou anticorpo, nunca é atingida, pois os ramos da curva de isofixação não são assíntotas verdadeiras, indicando que a fixação em todos os pontos depende de ambos os elementos, embora possa depender mais de um que de outro.

Na prática consideramos que a função

$$Q = f(W,Z)$$

possa ser tomada como:

$$Q = f(W)$$

ou como

$$Q = f(Z)$$

dependendo das proporções que esses elementos (antígeno ou sôro) estão presentes na mistura-reação.

Devemos no entanto considerar as curvas de isofixação obtidas com antiúgenos que apresentam a capacidade de inibir a reação, quando em excesso. É o caso típico da cardioplipina que apresenta curvas em que a assíntota horizontal passa por uma inflexão. A quantidade de antígeno que reage com o mínimo de sôro é indicada por um ponto bastante nítido correspondente à "dose de reatividade máxima", segundo WADSWORTH, MALTANER e MALTANER (1938), em seu trabalho sôbre a reação entre sôro sífilítico e extrato de tecido.

Curvas de isofixação no sistema tuberculose serviram para a determinação da proporção em que sôro e antígeno aquoso combinam-se para formar complexos com definida capacidade fixadora de complemento (WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, 1938). O método consistia em determinar as relações lineares entre sôro e complemento assim como as encontradas entre antígeno e complemento. Essas linhas de regressão eram comparadas pelo quociente de suas inclinações.

O quociente indicaria a capacidade de reação entre antígeno e anticorpo. Testes feitos em diversas ocasiões, demonstraram um quociente constante para cada sôro examinado, embora complemento e hemácias fossem diferentes. Manteve-se constante o antígeno aquoso nessa série de experiências. Essas relações encontradas na análise das curvas de isofixação iriam permitir a determinação quantitativa de antiúgenos ou anticorpo, por técnica de fixação de complemento.

LINEARIDADE ENTRE ANTÍGENO E COMPLEMENTO. INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE SORO PRESENTE NA REAÇÃO.

Os Gráficos 3 e 5 mostram exemplos típicos de curvas de isofixação, onde cada ponto traduz a quantidade de antígeno e a de anticorpo capazes de formar um complexo imune com determinada afinidade para o complemento.

Por conveniência de precisão, tomamos o ponto 50% de hemólise como referência. Assim, se 3 unidades de complemento são inicialmente juntadas aos tubos contendo diferentes concentrações de antígeno e de sôro, a reação se processa com intensidade bastante diversa, segundo a quantidade relativa dos elementos que formam o complexo fixador de complemento. Muitos tubos mostram hemólise total, outros nenhuma; entre esses extremos encontramos graus de hemólise parcial e diretamente ou por cálculo, determinamos o ponto 50% de hemólise.

Dessa forma são traçadas curvas de isofixação, para cada quantidade de complemento utilizadas normalmente; podemos então ter uma ou mais curvas e estudar as relações quantitativas entre os elementos da reação de fixação de complemento.

Verificamos nos Gráficos 3 e 5 que as assíntotas verticais das curvas de isofixação indicam praticamente a independência da fixação do complemento em relação à quantidade de sôro presente, desde que o último se encontre em grande excesso.

Realmente as quantidades necessárias de complemento para 50% de hemólise ($K' S_a$) nessas condições variam linearmente com a quantidade de antígeno presente na reação. São essas as condições necessárias e suficientes para a avaliação da reatividade do antígeno: excesso de sôro e determinação das quantidades de antígeno necessárias para formar complexos capazes de fixar duas, cinco, oito ou onze unidades de complemento, quando três, seis, nove e doze unidades estão inicialmente presentes na reação.

O título do antígeno é dado pela inclinação da linha de regressão encontrada entre complemento e antígeno, quando sôro está presente em largo excesso.

É no entanto necessário fazer um reparo a êsse tipo de dosagem que procura conhecer a capacidade de reação do antígeno, em condições que permitam uma

reação máxima. A dosagem indica a concentração do material antigênico e os títulos determinados por esse método servem para estudo comparativo entre antígenos de diversas partidas.

Para a comparação de antígenos empregamos um mesmo sôro, pois, como veremos, os parâmetros da linha antígeno-complemento sofrem alterações, quando as assíntotas verticais das curvas de isofixação não são paralelas ao eixo do sôro; a posição relativa das linhas de isofixação sofre variações segundo o sôro experimentado.

O método não nos informa sôbre a dose de antígeno a ser empregada na reação; a determinação das doses ótimas ou de máxima reatividade pode ser feita por diferentes métodos, utilizando sôro diluído.

A quantidade de sôro presente na dosagem de antígeno nos dá a inclinação da linha de regressão complemento-antígeno, com possíveis alterações no outro parâmetro que é a intersecção da linha com o eixo do complemento (ordenadas). Assim na família de curvas de isofixação do Gráfico 6, cada uma das quantidades de sôro empregado no teste exige, na zona das assíntotas verticais quantidades de antígeno para 50%, de hemólise. Essas quantidades de antígeno para 50% de hemólise. Essas quantidades de antígeno quando projetadas contra as quantidades de complemento usadas determinam pontos sôbre uma reta. Podemos ter assim diferentes linhas de regressão antígeno-complemento (Gráfico 6), cada uma delas com valores diversos não só de sua inclinação como de sua intersecção com o eixo das ordenadas. No Gráfico 6, vemos que das linhas traçadas, a que foi levantada com 0,0025 ml de sôro, teve sua origem em 1,0 unidade de complemento, com uma inclinação de 4800; outras quantidades de sôro influenciam os parâmetros da relação linear entre antígeno e complemento, quando as linhas de isofixação não são paralelas.

É preciso salientar que a intersecção da linha de regressão complemento-antígeno é apenas um ponto geométrico e a sua determinação é feita para permitir o cálculo do título do antígeno (pois é um dos parâmetros da reta), segundo W. M. M..

Se, no entanto, considerarmos o título do antígeno como igual à sua inclinação, poderemos comparar antígenos, desde que usemos o mesmo sôro. O título seria então:

$$\text{Título do antígeno} = \frac{\Delta \text{ complemento}}{\Delta \text{ antígeno}}$$

Êsse conceito foi adotado por RICE (1946) na titulação de antígenos preparados de vacina em presença de sôro de coelho imunizado.

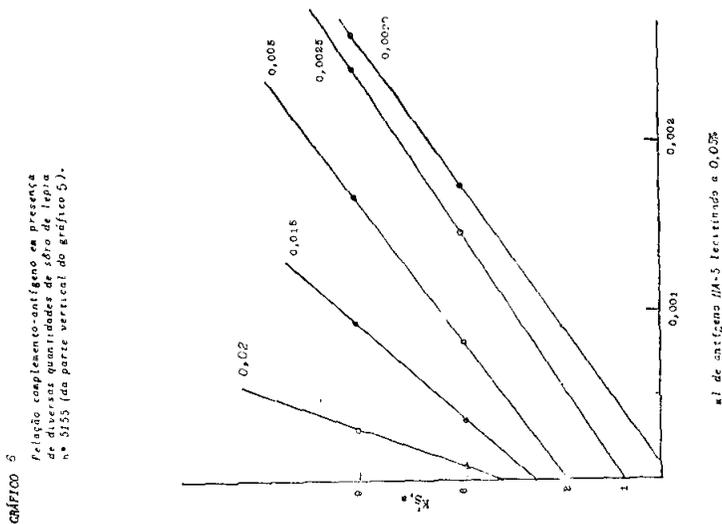
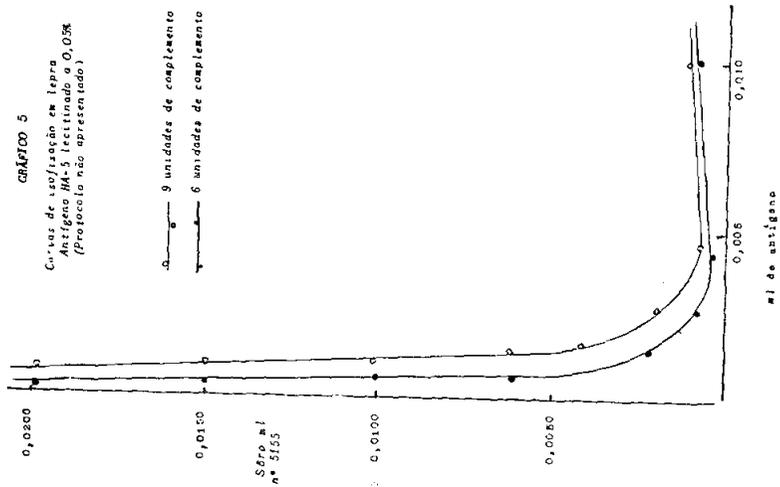
A relação entre complemento e antígeno pode ser utilizada como método da medida para a atividade antigênica, depois de conhecidas suas linhas de isofixação. Se são paralelas entre si e ao eixo do sôro (ordenadas) podemos empregar o processo com excesso de sôro, pois procuramos encontrar condições em que a capacidade de fixação do complemento do complexo dependa mais do elemento que está em menor proporção, que é o antígeno. A projeção antígeno-complemento na realidade significa projeção de complexo imune em termos de antígeno contra complemento necessário para 50% de hemólise.

Se as condições da reação permitirem tal tradução podemos dizer que

$$K'_{S,a} = a + b \cdot W$$

para Z em excesso.

Para uma determinada quantidade de sôro (Z) podemos dizer, que (se as relações entre sôro e antígeno estiverem na parte vertical da curva de isofixação) a quantidade de complemento fixado é diretamente proporcional à quantidade de antígeno (W) presente.



LINEARIDADE ENTRE SÔRO E COMPLEMENTO. INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE ANTÍGENO PRESENTE NA REAÇÃO.

Podemos verificar, analisando o Gráfico 4, que já com 0,010 ml de antígeno, as curvas de isofixação de três, seis, nove e doze unidades de complemento, ficam paralelas ao eixo do antígeno (abscissas). No caso presente, maiores quantidades de antígeno não afetam sensivelmente as quantidades de soro necessários para a formação de complexos capazes de fixar duas, cinco, oito ou onze unidades de

complemento, quando três, seis, nove e doze estão inicialmente presentes. Nessas condições a quantidade de complemento fixado dependerá da quantidade de sôro presente, se antígeno estiver presente na quantidade de 0,010 ml ou mais.

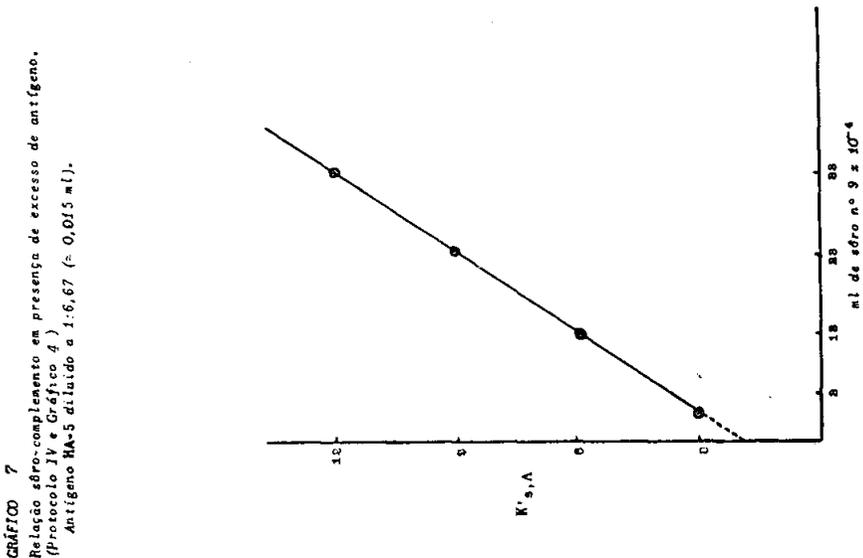
Essa é a condição ideal para a dosagem de soros, e então podemos dizer que a fixação é função da quantidade de sôro presente.

No entanto, somos obrigados aqui a fazer o mesmo reparo em relação à essa condição de dependência, uma vez que na realidade a formação do complexa fixador de complemento depende sempre do antígeno. As linhas de isofixação do Gráfico 4 são aparentemente assíntotas, mas se estendermos em maior amplitude de concentração o antígeno, podemos facilmente verificar que elas se aproximam da abscissa à medida que a concentração de antígeno aumenta. Outras vêzes a linha de isofixação sofre a influência da ação anticomplementar que então se faz sentir com as maiores doses de antígeno. Podemos dizer que condições devem ser procuradas para a reação de fixação do complemento, de forma a se obter uma proporcionalidade entre complemento fixado e a quantidade de anticorpo (em termos de sôro) presente, desde que antígeno esteja em concentração suficiente. Na verdade as assíntotas indicam uma relativa independência entre sôro e antígeno, em uma zona que se estende desde 0,010 ml até 0,020 ml de antígeno (Gráfico 4).

Projetando as quantidades de complemento necessárias para 50% de hemólise contra as quantidades de sôro usadas, determinamos pontos sôbre uma reta. Essa linha de regressão permite o cálculo do título do sôro em termos de sua inclinação. (Gráfico 7).

Evitamos, de propósito, distinguir qual a quantidade de antígeno que deve ser usada na titulação do sôro. Nos trabalhos de fixação do complemento, ênfase é dada à propriedade que certos antígenos possuem, de inibir a reação, quando em excesso; um exemplo é dado pela cardiolípin e sôro sífilítico. (ver Gráfico 10).

Neste caso a dose de antígeno a ser usada deve ser relativa à intensidade da reação esperada, que por sua vez, depende da quantidade de anticorpos presentes no sôro em exame.



Nos antígenos preparados de bacilos da tuberculose podemos encontrar êsse efeito zonal, com maior ou menor intensidade, não só na reação com sôro de lepra, como também nos contrôles da ação anticomplementar do antígeno.

A determinação da quantidade de antígeno necessária para produzir uma reação máxima é feita experimentando-se diferentes diluições de antígeno com outras de sôro, complemento sendo constante. A quantidade de antígeno capaz de evidenciar a menor quantidade de sôro reagente é tomada como "dose de máxima reatividade".

A dose de máxima reatividade varia para cada quantidade de complemento usada no teste. Em técnicas que empregam quatro diferentes concentrações de complemento, como a de W. M. M. existem quatro doses de reatividade máxima determinadas para o mesmo antígeno.

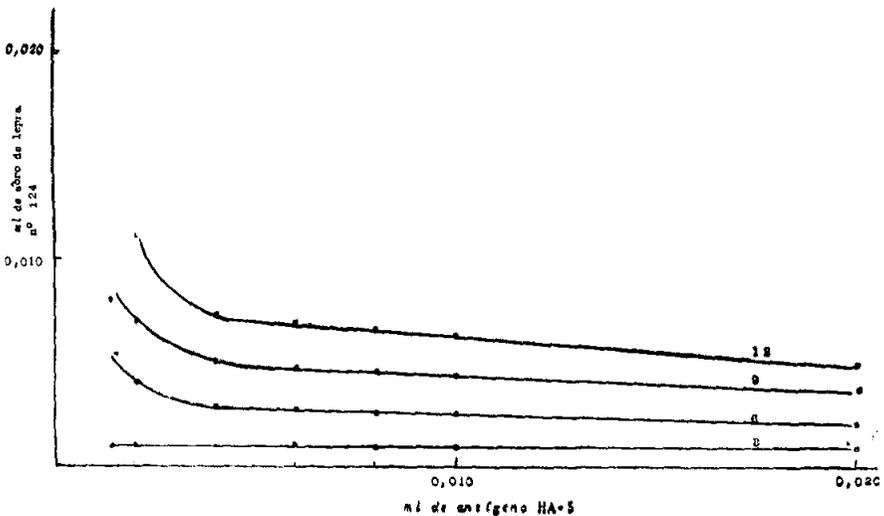
Um fato corrente é a verificação que a dose de reatividade máxima pode diferir segundo o sôro examinado. As doses de máxima reatividade oscilam em redor de uma média que seria "uma dose de antígeno" suficiente para a maioria dos soros em um sistema.

A técnica de W. M. M. obriga ao uso de várias diluições de antígeno para cada quantidade de complemento usado e tôdas as reações obtidas são comparadas para sempre se poder determinar a "reação máxima".

Dessa forma, quando podemos evitar o efeito zonal do antígeno e a determinação de "uma dose de máxima reatividade", simplificamos a técnica com diminuição do trabalho envolvido. Nesse caso uma única diluição de antígeno poderia servir às reações praticadas com quatro concentrações de complemento. Tal é o caso exemplificado no Gráfico 9 onde 0,02 ml de antígeno foram suficientes para as reações com três, seis, nove e doze unidades de complemento. O efeito do antígeno sôbre as reações quantitativas com sôro de lepra é ilustrado no Protocolo V e Gráfico 8, onde as linhas horizontais de isofixação mostram que maiores concentrações de antígeno tem pouco efeito sôbre a reação.

GRÁFICO 9

Curvas de isofixação com antígeno HA-5 e sôro de lepra nº 124, com quatro quantidades de complemento. (Protocolo V)



PROTOCOLO V

CURVAS DE ISOFIXAÇÃO COM EXCESSO DE ANTÍGENO (Gráfico 8)

SÔRO DE LEPRA N.º 124	ml DE ANTÍGENO HA-5 LECITINADO A 0,05%							
	0,020	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,0016	0,0012
	HEMÓLISE % COM 8 UNIDADES DE COMPLEMENTO							
0,0010	10	10	10	20	25	40	50	50
0,0008	45	50	55	60	65	65	65	70

	COM 6 UNIDADES							
0,0080	0	0	0	0	0	0	0	10
0,0060	0	0	0	0	15	40	70	85
0,0030	0	0	20	25	55	85	100	100
0,0020	45	65	80	85	90	100	100	100

	COM 9 UNIDADES							
0,0100	0	0	0	0	0	0	80	90
0,0080	0	0	0	0	0	35	80	100
0,0060	0	0	0	15	20	90	100	100
0,0050	0	35	35	50	55	100	100	100
0,0040	10	65	70	95	100	100	100	100

	COM 12 UNIDADES							
0,0500	0	0	0	0	0	0	0	20
0,0300	0	0	0	0	0	0	10	65
0,0200	0	0	0	0	0	0	20	85
0,0100	0	0	0	0	0	90	100	100
0,0080	0	0	15	25	30	100	100	100
0,0060	0	65	75	80	85	100	100	100
0,0050	30	90	100	100	100	100	100	100
0,0040	70	100	100	100	100	100	100	100

CONTROLES

	DO ANTÍGENO COM 2 UNIDADES DE COMPLEMENTO							
	80	80	85	90	90	100	100	100

DO SÔRO (0,05 φ) COM:		DO COMPLEMENTO COM:		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	1 U	2 U	
55	100	15	90	0%

As porções horizontais das curvas de isofixação do Gráfico 8 tendem a se mostrar assintóticas ao eixo das abscissas; no entanto, podemos verificar que, embora as linhas tenham essa tendência, preenchendo as condições necessárias para a dosagem do sôro, elas na realidade sofrem em todos os pontos a influência da quantidade de antígeno presente na reação (Protocolo V).

Se considerarmos que na porção horizontal as curvas de isofixação mostram pontos que mais dependem da quantidade de sôro presente, as condições requeridas de que

$$Q = f(Z)$$

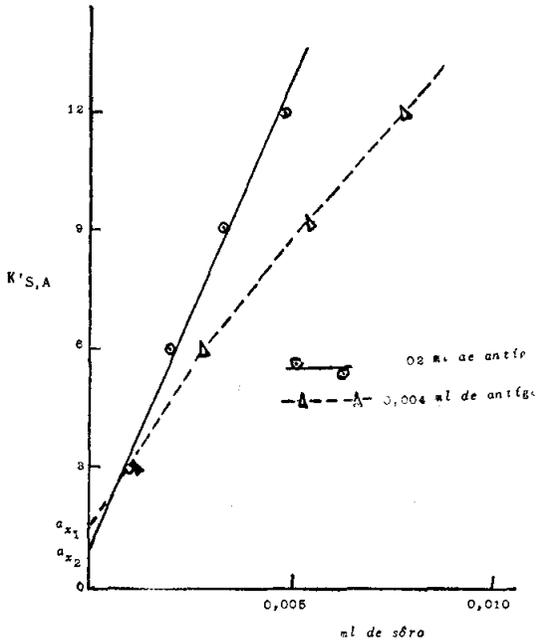
são praticamente atingidas. Nesse caso a projeção de complemento necessário para 50% de hemólise contra sôro, determina pontos sôbre uma reta.

O título do sôro seria dado pela quantidade de complemento necessária a 50% de hemólise, quando 0,05 ml de sôro reagem com antígeno suficiente para uma reação máxima, como mostra o Gráfico 9.

GRÁFICO 9

Relação sôro-complemento. Influência da quantidade de antígeno sôbre os parâmetros da linha de regressão.

OBSERVAÇÃO: o parâmetro a da equação $K'S,A = a + b.Z$ é a distância entre o ponto a_x e a interseção da linha de regressão com o eixo das ordenadas.



O título do soro é calculado, pelo método dos acréscimos proporcionais. Verificamos qual o acréscimo de $K'_{s,A}$ produzido por acréscimo correspondente de soro. Calculamos então, por proporção, qual seria a quantidade de complemento para 0,05 ml de soro:

$$\text{Título do soro} = \frac{\Delta K'_{s,A} \cdot 0.05}{\Delta Z}$$

Essa relação vai permitir calcular os títulos de um soro, para diferentes quantidades de antígeno.

A linha de regressão soro-complemento intercepta o eixo de $K'_{s,A}$ em um ponto que nos trabalhos de fixação de complemento de W. M. M. é chamada de C' . Essa denominação é bastante infeliz, uma vez que C' tem sido empregado para significar complemento. Seria mais lógico chamar êsse ponto de "a" pois nada mais é que um dos parâmetros da reta:

$$K'_{s,A} = a + b.Z$$

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO SOBRE OS PARÂMETROS DA LINHA DE REGRESSÃO SORO-COMPLEMENTO.

A relação entre soro (Z) e complemento necessário para 50% de hemólise nas condições do teste descrito nos capítulos anteriores é dada pela reta:

$$K'_{s,A} = a + b.Z$$

No Gráfico 9 podemos ver que o ponto a foi determinado por projeção sobre o eixo do complemento, da reta traçada entre 3 e 12 unidades. Vamos estudar o significado de a , utilizando os dados das linhas de isofixação de Gráfico 8, Protocolo V, e projetando soro contra complemento, para duas concentrações de antígeno: 0,02 ml e 0,004 (Gráfico 9). Os dados são apresentados no Quadro II.

QUADRO II

RELAÇÕES QUANTITATIVAS ENTRE ANTÍGENO, SORO E COMPLEMENTO

ANTÍ-GENO ml	ml DE SORO N.º 124 PARA K' IGUAL À				VALOR DE a
	3	6	9	12	
0,020	0,001	0,002	0,0035	0,0047	1,0
0,004	0,001	0,0028	0,0052	0,0078	1,5

A projeção de K' contra soro determina uma reta quando 0,020 ml de antígeno estão presentes, a tendo um valor de 1,0; quando porém, menor quantidade de antígeno é usada, como 0,004 ml, os pontos não ficam sobre uma reta, mas descrevem uma curva. A intersecção da linha traçada entre 3 e 6 unidades de complemento tem um valor de $a = 1,5$.

Essa observação sugere ser o ponto a dependente da quantidade de antígeno presente na reação. Quando as curvas de isofixação tornam-se paralelas entre si, há proporcionalidade entre complemento necessário para 50% de hemólise e a quantidade de soro presente, antígeno sendo constante em todos os tubos da reação. As quantidades de soro projetadas em abscissas e complemento em ordenadas são os dados de que a técnica de W. M. M. se utiliza para a determinação do título do soro, pelo prolongamento da reta, até determinar nas ordenadas o número de unidades de complemento necessário para 50% de hemólise, quando 0,05 ml de soro é tomado como referência.

Para haver proporcionalidade entre soro e complemento não há necessidade das linhas de isofixação serem paralelas ao eixo do antígeno; basta que sejam paralelas entre si.

Esse fato é bastante evidente quando se traçam curvas de isofixação com antígenos que apresentam o fenômeno de zona. Um exemplo pode ser dado com a cardiolipina que apresenta nitidamente uma dose de máxima reatividade para três unidades e outra para seis unidades de complemento (Gráfico 10).

O Quadro III mostra os dados colhidos numa experiência desse tipo.

QUADRO III

PARÂMETRO DAS LINHAS DE REGRESSÃO SORO-COMPLEMENTO, PARA DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE CARDIOLIPINA.

ANTÍGENO CARDIO- LIPINA	ml DE SORO SIFILÍTICO NECESSÁRIOS PARA K' IGUAL A:		PARÂMETROS DA LINHA DE REGRESSÃO SORO-COMPLE- MENTO.	
	3	6	a	b
0,0013	0,0034	0,0090	+ 1,2	536
0,0015	0,0034	0,0080	+ 0,7	652
0,0010*	0,0034			
0,0020**		0,0060	— 0,9	1154
0,0060	0,0064	0,0090	— 4,0	1154
0,0100	0,0070	0,0096	— 4,8	1154
0,0200	0,0074	0,0100	— 5,4	1154

* Dose de máxima reatividade para 3 unidades de complemento;
** Dose de máxima reatividade para 6 unidades de complemento.

As linhas de regressão traçadas possuem diferentes parâmetros; os valores, de a indo de positivo a negativo, de acordo com a quantidade de antígeno presente (Gráfico 11). Observamos no entanto que a partir de 0,0020 ml de antígeno as linhas de regressão ficaram paralelas entre si (o mesmo valor de b) e se o título do soro for calculado como

$$\text{Título} = \frac{\Delta K'_{s,A} \cdot 0,05}{\Delta Z}$$

encontraremos o valor de 57,8 constante para reações feitas com diversas concentrações de

antígeno, que não mostram influência sobre o título, mas sobre a reação (alteração dos parâmetros).

A experiência é bastante ilustrativa e mostra os seguintes pontos:

1.º A dose de antígeno de máxima reatividade deve ser empregada quando se quer evidenciar quantidades pequenas de anticorpos, por exemplo, nas reações qualitativas de fixação do complemento.

2.º Não há necessidade, nem obrigatoriedade de se usar "doses de reatividade máxima" para titular soros reagentes, quando se emprega o método dos acréscimos proporcionais.

3.º A experiência acumulada em reações de fixação do complemento mostra que a dose de reatividade máxima do antígeno é uma quantidade de antígeno que produz o máximo de reação com "a maioria dos soros em um determinado sistema". É uma quantidade estatisticamente determinada e isso quer dizer que a dose de máxima reatividade não é a mesma para todos os soros. Para um determinado soro, a fim de se obterem reações máximas, somos obrigados a empregar diluições de antígeno, em redor da dose média conhecida e suposta ótima. O uso de antígeno mais diluído afeta a proporcionalidade entre complemento e soro, sendo particularmente evidente as mudanças ocorridas nos valores de b , que é a inclinação da linha de regressão soro-complemento.

O uso de doses maiores de antígeno afeta apenas o valor do parâmetro a e assim os títulos por acréscimo não são alterados.

4.º A importância prática desse achado deve aqui ser salientada, pois o conceito de dosar antígenos, para se encontrar a dose de máxima reatividade para cada concentração de complemento, deve ser aplicado apenas às reações qualitativas. Para as reações quantitativas já não procuramos a quantidade de antígeno que satisfaz a maioria dos soros em um sistema, mas apenas necessitamos de conhecer qual a dose de antígeno que produz "reações paralelas" com três, seis, nove e doze unidades de complemento.

A dose deve compreender "uma zona de diluições" de antígeno, na qual a condição de paralelismo das curvas de isofixação é satisfeita.

No exemplo dado no Gráfico 10 podemos escolher a dose de 0,0100 de cardioplipina para reações com 3 e 6 unidades de complemento; as doses de máxima reatividade são respectivamente 0,00075 e 0,00160, segundo MALTANER e MALTANER, 1945 para cardioplipina n.º 72. No entanto, no soro examinado, as doses de máxima reatividade foram de 0,0010 e 0,0020 ml de antígeno, respectivamente para 3 e 6 unidades de complemento. Se a reação tivesse sido feita com supostas doses ótimas de cardioplipina, a linha de regressão soro-complemento (ver Gráfico II) teria os seguintes parâmetros: $a = 0$, $b = 730$, com grande alteração do título do soro, pois, como se pode verificar no Gráfico 10, essas doses de antígeno se localizam exatamente na zona em que a curva de isofixação depende igualmente tanto do soro como do antígeno. Convém lembrar que a titulação do soro se procura fazer na zona em que a curva de isofixação depende primeiramente do soro.

No Gráfico II pode-se verificar que quando se computam os valores de soro e de complemento nas reações praticadas com "as verdadeiras doses ótimas de antígeno" os valores dos parâmetros são: $a = -0,9$ e $b = 1154$. O valor de b é o mesmo que os achados com doses maiores de antígeno e sendo o título função de b , vemos que depois da concentração ótima as determinações dão o mesmo título, independente da concentração de antígeno.

5.º Dessa forma, a dose de antígeno a ser empregada numa titulação de soro deve ser aquela que não afeta o relativo paralelismo das curvas de isofixação. As doses de máxima reatividade satisfazem essa condição, imprimindo à reação o máximo de sensibilidade. Nesse caso reações preliminares para evidenciar soros reagentes, devem ser feitas com dose de antígeno de reatividade máxima; a dosagem, no entanto, do soro reagente deve ser feita com doses de antígeno de "reatividade paralela".

Essa noção, quando aplicada, em muito simplifica o método quantitativo de W. M. M., pois passamos a usar uma única dose de antígeno para três, seis, nove ou doze unidades de complemento.

O método tem a vantagem de não se prender a uma dose crítica de antígeno, pois variações consideráveis da "dose de reatividade paralela" não afetam o valor de $\Delta K'_{s,A}$, não alterando portanto o título do sôro.

Trabalhando com antígeno em excesso, alteramos a reação, mas não seu paralelismo, mesmo quando o antígeno apresenta intensos fenômenos de inibição.

As doses de reatividade paralela afetam o valor de a , mas não de b , da relação sôro-complemento.

*
* *
* *

Até agora estudamos a inclinação da linha de regressão sôro-complemento e concluímos que condições para a titulação do sôro são encontradas quando as linhas de regressão citadas apresentam o mesmo valor de b .

O outro parâmetro da linha de regressão é a sua intersecção com o eixo do complemento. Verificamos que seu valor é grandemente alterado por efeito da quantidade de antígeno presente, porém o seu significado deve ser procurado, pois é de interesse prático e teórico.

Lógicamente, se antígeno e sôro não são anticomplementares, as linhas de regressão devem sair de 1,0 unidade de complemento, no eixo das ordenadas, pois quando sôro é igual a zero, deve ser necessário apenas uma unidade de complemento para 50% de hemólise, por definição.

Na projeção da linha sôro-complemento sobre o eixo das ordenadas, vemos que o parâmetro a pode ser de grandeza muito variável, como ponto extrapolado e não representa um dado experimental. O ponto a deve ser o controle do antígeno, que com uma unidade deverá, na ausência de sôro, dar hemólise próxima de 50%.

Se fizermos as reações com menores quantidades de sôro que aquela que reage com 3 unidades de complemento, e empregarmos uma, duas unidades de complemento, podemos traçar toda a curva que relaciona sôro com complemento e determinar experimentalmente o ponto em que a curva se inicia, no eixo das ordenadas. O Quadro IV nos dá os valores encontrados experimentalmente. Os dados da experiência foram projetados no Gráfico 12. Verificamos que o valor de a decresce à medida que aumenta a concentração de antígeno empregado na reação.

Valores negativos de a significam que a reação de fixação do complemento se inicia depois de certa quantidade de sôro. Assim, por exemplo, quando antígeno está presente na concentração de 0,0100 ml, a fixação de complemento começa depois de 0,006 ml de sôro; a razão desse fenômeno parece depender diretamente da quantidade de antígeno presente. Quando este está em excesso, o complexo antígeno-anticorpo formado se dissolveria no antígeno, até uma certa concentração, depois da qual já não haveria suficiente antígeno para produzir esse efeito. Realmente, menor quantidade de antígeno (por exemplo 0,0033), já mostra fixação do complemento com 0,003 ml de sôro.

O valor negativo de a pode ser interpretado como efeito do antígeno sobre o complexo antígeno anticorpo formado.

Quando a quantidade de antígeno se aproxima do ótimo de proporções com o sôro, o valor de a tende para 1,0; nessas condições a fixação do complemento se inicia com quantidades mínimas de sôro e daí a maior sensibilidade da reação.

Valores positivos de a podem ser considerados índice de falta de antígeno para atingir a zona de reatividade paralela. Linearidade entre sôro e complemento pode ser alcançada porém a inclinação não é a mesma e o ponto a determinado geometricamente sempre é maior que 1,0 (Gráfico 11).

QUADRO IV

RELAÇÃO ENTRE SÔRO E COMPLEMENTO, EM FIXAÇÕES COM EXCESSO DE ANTÍGENO (Exemplo: cardiopina e sôro sífilítico)

ANTI-GENO <i>ml</i>	SÔRO <i>ml</i>	K's, A	PARÂMETROS		TÍTULOS DO SÔRO (por acréscimo)
			<i>a</i>	<i>b</i>	
0,0100	0,0170	9,0	— 25,5	1.500	75
0,0100	0,0150	6,0			
0,0100	0,0130	3,0			
0,0100	0,0105	2,0			
0,0100	0,0080	1,4			
0,0100	0,0060	1,2			
0,0100	0,0040	1,1			
0,0100	0,0020	1,1			
0,0100	salina	1,1			
0,0033	0,0106	9,0			
0,0033	0,0086	6,0			
0,0033	0,0066	3,0			
0,0033	0,0055	2,0			
0,0033	0,0040	1,3			
0,0033	0,0030	1,2			
0,0033	0,0020	1,1			
0,0033	salina	1,1			

GRÁFICO 10

Curvas de isofixação com antígeno apresentando inibição quando em excesso (tipo cardiopina). (ALMEIDA, 1955)

Curvas com 3 e 6 unidades de complemento.

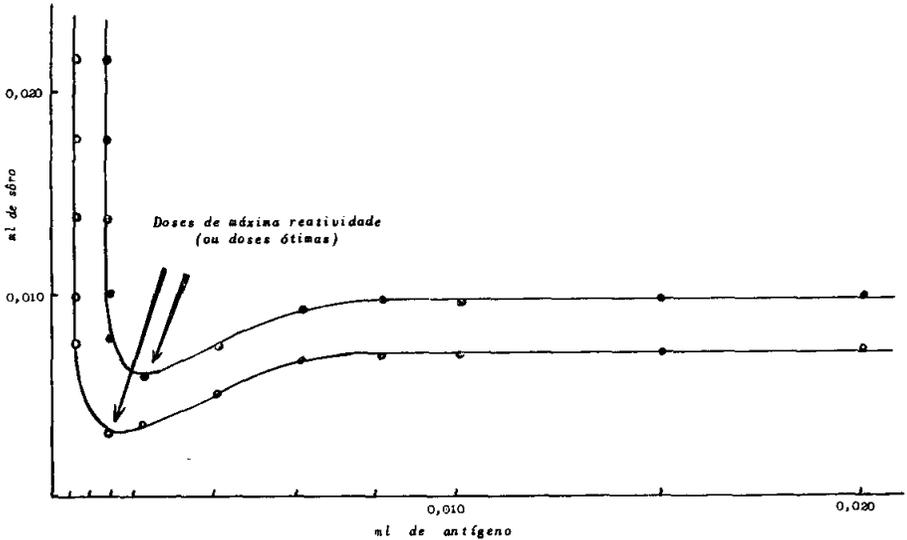


GRÁFICO 12

Efeito da concentração do antígeno sobre os parâmetros da linha de regressão soro-complemento.

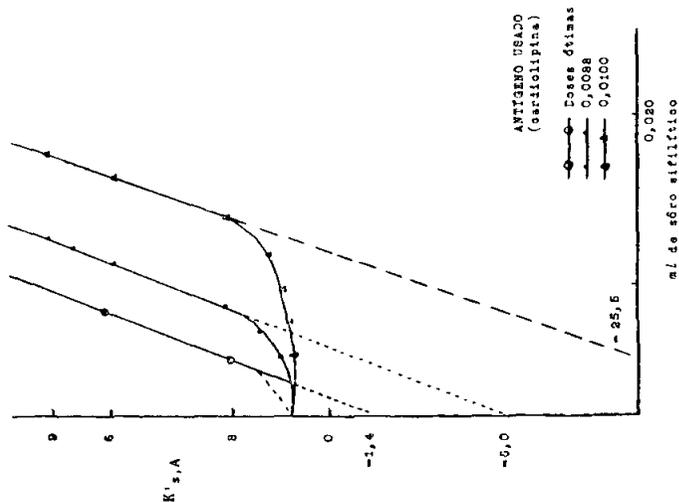
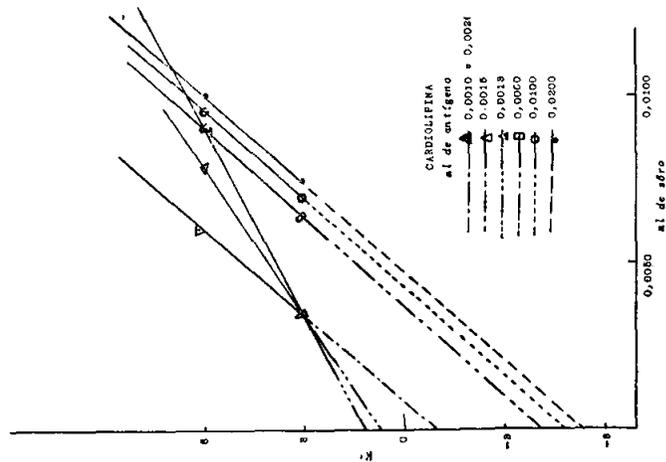


GRÁFICO 11

Linhas de regressão traçadas no sistema: soro-complemento, quando diferentes concentrações de antígeno são usadas. (Dados do Quadro III)



O método quantitativo de fixação do complemento aqui discutido e estudado para o sistema lepra, avalia a reatividade do soro em termos de complemento necessário para 50% de hemólise para um acréscimo de 0,05 ml de soro.

Difere da técnica de W. M. M. pois o título do soro é avaliado em termos da inclinação que a linha de regressão soro complemento possui, para um valor determinado de soro, arbitrariamente tomado como 0,05 ml. O método dos acréscimos proporcionais foi utilizado por RICE (1947) que encontrou concordância entre títulos de fixação de complemento e valores obtidos por testes de precipitação no sistema pneumococos.

ANTÍGENOS AQUOSOS DO BACILO DA TUBERCULOSE. EFEITOS SÔBRE O COMPLEMENTO. ANTÍGENOS AQUOSOS LECITINADOS.

Antígenos aquosos preparados do bacilo da tuberculose, como descrito anteriormente, ou por simples ebulição de bacilos em água destilada, mostram um efeito anticomplementar zonal, de grande intensidade.

O Protocolo VI nos mostra que tal efeito é observado não só quando se emprega o complemento liofilizado, preparado de grande número de soros de cobaia, como quando complementos individualmente provados são utilizados. Cabe aqui um reparo sôbre a impropriedade de tal teste, se praticado com uma única diluição de antígeno, pois dará resultados completamente falsos, como se poderá constatar no Protocolo VI.

Os testes de anticomplementaridade ou reatividade inespecífica entre complemento e antígeno, praticados com 8 diferentes misturas de complemento, dariam informações erradas se realizados com uma única dose de antígeno, pois poderiam indicar ausência de ação não específica, perfeitamente evidenciável com outras diluições de antígeno.

A presença de sôro humano normal na reação diminui o efeito zonal e o desloca (Protocolo VII), porém não o evita.

O sôro humano usado na experiência provinha de crianças entre 2 e 5 anos de idade, com reação negativa à tuberculina (Mantoux a 1:10).

O Protocolo VIII ilustra uma experiência feita com o antígeno aquoso precipitado. Verificamos nítida ação zonal em controles do antígeno; enquanto antígenos concentrados não se mostram anticomplementares (diluições a 1:5 e 1:10), quando diluídos são capazes de fixar mais de 2 unidades de complemento, na ausência de sôro. Essa observação traz como corolário a necessidade de se controlar a ação anticomplementar, com várias diluições do antígeno. Efeito zonal semelhante é observado nos tubos de reação, onde diluições de antígeno mostram atividade máxima. E então necessário indagar se o efeito zonal observado nos tubos de reação não é mais a reprodução do mesmo efeito ocorrido nos tubos contrôles do antígeno (Protocolo VIII e Gráfico 13).

O efeito da lecitina sôbre o antígeno aquoso se faz sentir, não só na reação em que sôro de lepra está presente, como também nos próprios controles do antígeno. O Protocolo IX, mostra uma titulação feita no mesmo sôro de lepra n° 8954 com antígeno aquoso 28 (OB) lecitinado a 0,05%.

A junção da lecitina faz desaparecer o efeito zonal e a linha de regressão sôro-complemento intercepta o eixo das ordenadas (complemento) em um ponto mais próximo do valor ideal que é 1,0. (Gráfico 15)

A quantidade de lecitina usada foi de 0,05% e o método para sua mistura com o antígeno consistiu em juntar a quantidade necessária da solução alcoólica de lecitina ao antígeno não diluído para a desejada concentração final de 0,05%.

Voltaremos ao estudo do antígeno aquoso lecitinado quando então faremos um estudo comparativo entre antígenos solúveis em piridina e antígenos aquosos.

PROTOCOLO VI

ACÇÃO ANTICOMPLEMENTAR DO ANTÍGENO AQUOSO NÃO LECITINADO, EM
PRESENÇA DE SOLUÇÃO SALINA BORATADA.

ANTÍGENO 28 (OB)

DILUIÇÃO DO ANTI- GENO N.º 28 (OB)	COMPLEMENTOS LIOFILISADOS; PARTIDAS NUMERADAS											
	N.º 1			N.º 2			N.º 3			N.º 4		
	HEMÓLISE % COM UMA, DUAS OU TRÊS UNIDADES											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1:5	20	90	100	25	90	100	25	95	100	25	90	100
1:10	15	80	100	25	80	100	25	80	95	20	90	100
1:20	15	70	85	15	60	70	15	65	80	15	80	95
1:40	10	40	55	15	30	55	15	35	55	15	35	55
1:66,7	0	30	55	10	30	65	0	30	55	15	35	60
1:100	0	25	70	10	25	85	0	30	75	10	35	75
1:167	0	30	85	0	50	100	0	30	90	0	40	95
1:333	0	65	100	0	70	100	0	70	100	0	80	100
1:500	0	75	100	15	75	100	0	70	100	10	95	100

	N.º 5			N.º 6			N.º 7			N.º 8		
1:5	20	95	100	15	90	100	25	90	100	40	95	100
1:10	30	95	100	15	75	100	20	60	65	35	80	95
1:20	20	85	95	0	35	40	15	30	35	20	30	55
1:40	20	60	75	0	15	25	10	15	25	10	15	25
1:66,7	15	45	85	0	10	40	0	20	35	0	0	35
1:100	10	45	85	0	15	45	0	15	45	0	15	50
1:167	0	60	100	0	25	75	0	25	80	0	25	95
1:333	0	90	100	0	55	95	0	70	100	0	80	100
1:500	0	90	100	0	60	100	0	80	100	10	90	100

COMPLEMENTOS LIOFILISADOS EM:		CONTRÔLE DO COMPLEMENTO	
		1 U	2 U
N.º 1	28- 9-51	45%	100%
N.º 2	20- 4-51		
N.º 3	27- 4-51	DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS	
N.º 4	10- 1-52		
N.º 5	3-10-52	0%	
N.º 6	26- 9-52		
N.º 7	4- 5-51		
N.º 8	6-10-53		

Incubação 18 horas a 3 — 6°C para evitar a deterioração do complemento (1 unidade) pelo calor. Hemólise em 15 minutos a 37°C.

PROTOCOLO VII

AÇÃO ANTICOMPLEMENTAR DO ANTÍGENO AQUOSO NÃO LECITINADO EM PRESENÇA DE SORO HUMANO NEGATIVO.

DILUIÇÃO DO ANTÍGENO	REAÇÕES EM PRESENÇA DE 0,05 ml DE SORO E UMA, DUAS E TRÊS UNIDADES DE COMPLEMENTO														
	SÓRO 1			SÓRO 2			SÓRO 3			SÓRO 4			SALINA		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	
5	35	90	100	35	90	100	35	100	100	100	20	65	95	35	100
10	15	60	90	25	90	100	15	70	100	100	15	70	100	30	90
20	0	65	90	20	85	100	0	40	100	100	25	75	95	25	55
40	0	80	100	20	80	100	0	50	100	100	20	80	100	15	25
66,7	10	90	100	25	85	100	0	60	100	100	20	75	100	0	20
100	15	90	100	25	90	100	0	85	100	100	25	80	100	0	20
125	15	100	100	25	90	100	10	85	100	100	20	80	100	0	25
167	20	100	100	20	100	100	15	90	100	100	25	85	100	0	35
250	25	100	100	30	85	100	25	100	100	100	25	90	100	10	50
333	30	90	100	30	85	100	25	100	100	100	25	90	100	10	65
500	30	90	100	35	95	100	30	100	100	100	35	100	100	15	80
CONTROLE DO COMPLEMENTO												50	100		

Incubação: 18 horas a 3 — 6°C. Hemólise em 15 minutos a 37°C.
Os soros (1-2-3 e 4) são de crianças tuberculino-negativas.

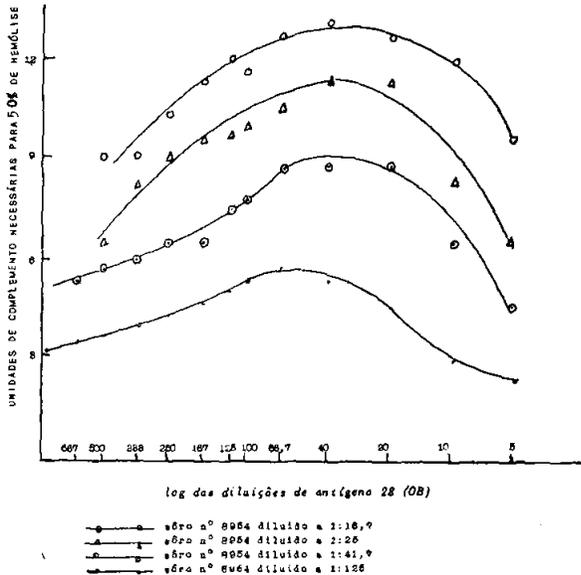
PROTOCOLO VIII (Gráfico 13)

REAÇÕES COM ANTÍGENO AQUOSO SEM LECITINA 28 (OB) E SÔRO DE LEPRA N.º 8954

ANTÍGENO DILUÍDO	SÔRO 8954 DILUÍDO A:					CONTRÔLE DO ANTÍGENO		
	125	41,7	25	16,7				
	UNIDADES DE COMPLEMENTO							
	3	6	6	9	12	1	2	3
1:5	90	100	90	90	85	25	95	100
1:10	65	100	40	65	50	25	85	90
1:20	5	95	10	25	40	20	25	35
1:40	0	75	10	25	35	0	10	25
1:66,7	0	55	10	30	40	0	0	25
1:100	0	75	15	35	55	0	10	55
1:125	0	80	20	40	50	0	25	80
1:167	5	100	35	45	60	0	25	90
1:250	10	100	35	50	75	0	45	90
1:333	30	100	50	65	90	0	60	95
1:500	35	100	55	90	90	0	75	100
1:667	45	100	75	95	100	10	85	100
1:1000	50	100	80	100	100	15	90	100

GRÁFICO 13

Reação entre sêro de lepra e antígeno aquoso (28(OB)) sem lecitina.



PROTOCOLO IX (Gráfico 14)

REAÇÕES COM ANTÍGENO AQUOSO 28 (OB) LECITINADO A 0,05% (MÉTODO II).
E SÔRO DE LEPRAS N.º 8954.

DILUIÇÃO DO ANTÍ- GENO	SÔRO 8954								CONTRÔLE DO ANTÍGENO		
	1:125		1:41,7		1:25		1:16,7				
	UNIDADES DE COMPLEMENTO										
	3	6	3	6	6	9	9	12	1	2	3
5	25	100	0	70	20	75	30	70	35	80	100
10	25	100	0	70	20	75	30	70	35	80	100
20	25	100	0	70	20	75	30	70	40	75	100
40	25	100	0	70	15	75	35	75	35	70	100
66,7	25	100	0	70	20	80	35	75	25	75	100
100	25	100	0	80	25	85	45	80	20	80	100
125	30	100	0	85	25	85	40	80	30	90	100
167	40	100	0	85	35	90	45	85	40	100	100
250	60	100	0	90	50	100	50	95	45	100	100
333	70	100	10	100	55	100	70	100	40	100	100
500	85	100	25	100	75	100	80	100	40	100	100
667	90	100	35	100	85	100	90	100	35	100	100
1000	100	100	50	100	90	100	100	100	35	100	100
CONTRÔLE DO COMPLEMENTO									25	95	100

Incubação 90 minutos a 37° C. Hemólise 15 minutos a 37° C.

GRÁFICO 14

Reação entre sêro de lepra e antígeno aquoso (28(OB))
com 0,05% de lecitina.

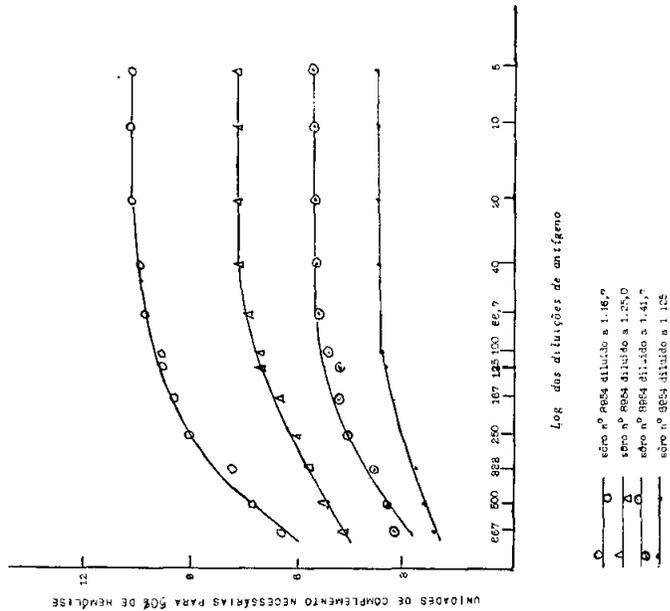
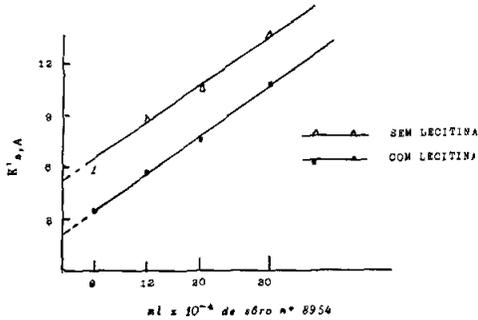


GRÁFICO 15

Linearidade entre sêro's antigêno,
com ou sem lecitina.



EFEITO DA LECITINA SÔBRE OS ANTÍGENOS SOLÚVEIS EM PIRIDINA. INFLUÊNCIA DO MODO DE SE MISTURAR A LECITINA E DE SUA DOSE. COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS.

Segundo a observação de STATINÉANU e DAMELOPOLU (1909), a lecitina poderia agir como antígeno nas reações de fixação de complemento com sêro de doente de lepra ou com líquido céfalo-raqueano.

A lecitina juntada aos extratos alcoólicos de bacilos da tuberculose aumentava a potência de 80 a 160 vezes em provas de fixação de complemento, segundo DIENES e SCHIFF (1926).

Em 1931, WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN descreveram o antígeno solúvel em piridina e usaram lecitina nas doses de 0,03 a 0,06%.

Em 1943 EICHBAUM confirmou os achados de STATINÉANU e DAMELOPOLU, utilizando suspensões salinas de lecitina comercial; observou então que havia diferença de marca para marca. Obteve 61% de positividade em reações de fixação do complemento praticadas em 229 soros leprosos.

A lecitina do comércio é uma mistura de isômeros, com outras impurezas como cefalina. A cefalina possui ação reforçadora sôbre extratos bacterianos na sêro-diagnose da leprose. O antígeno com cefalina teria sido capaz de evidenciar casos de lepra iniciais, enquanto o mesmo antígeno sem cefalina mostrava-se desprovido de ação fixadora, segundo ICHIATA (1940).

Os autores que usaram lecitina comercial — SACHS e KLOPSTOCK (1925), ORNSTEIN (1926) — obtiveram soros imunes em coelhos; entretanto aqueles que empregaram lecitina purificada — LEVENE, LANDSTEINER e VAN DER SCHEER (1927), PLAUT e RUDY (1932), WADSWORTH, MALTANER e MALTANER (1934) — não conseguiram obter soros imunes em coelhos nem evidenciar qualquer reação de fixação do complemento entre os soros preparados e a lecitina comercial; de outro lado, confirmaram as observações anteriores sôbre lecitina comercial. Soros preparados com lecitina comercial não reagem com lecitina purificada.

Os preparados purificados podei iam ter difícil dispersão em salina e isso seria a principal causa de sua não reatividade, como sugeriram WEIL e BESSER (1931); essa hipótese não foi confirmada por WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, (1934) que não observaram diferenças na dispersão da lecitina purificada por precipitação com cloreto de cádmio em comparação com a lecitina MERCK (lecitina de ovos).

LEVENE, LANDSTEINER e VAN DER SCHEER (1927) sugerem que "*a substância ativa na formação de anticorpos não é a lecitina, mas alguma outra substância presente nos preparados de lecitina comercial*".

É de interesse assinalar que MALTANER e MALTANER (1945), na padronização dos antígenos de cardioliipina, experimentaram suspensões de lecitina purificada de coração de boi, com soros negativos e soros fortemente positivos para a sífilis e não observaram inibição de hemólise em soro não reagente, mas notaram moderado grau de reação com um dos 15 soros sífilíticos. Concluíram que a lecitina por si só não é antigênica mas que "*em certas condições poderá reagir com determinados soros*". Anteriormente, com lecitina purificada de fígado WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, 1934, encontraram 5 reações positivas em 83 soros sífilíticos. Essa incidência não está longe da percentagem encontrada (8%) por EICHBAUM (1943) em condições semelhantes.

Em 11 misturas de soros de lepra lepromatosa, com títulos maiores que 12 com o antígeno HA-5, observamos apenas duas reações de títulos menores que 6.; um dos soros reagia com cardioliipina e com título 100. Era uma mistura de soros de doentes da lepra, com sorologia para sífilis positiva e com história de infecção luetica.

DISPERSÃO DA LECITINA.

O modo como a lecitina é dispersa em solução do antígeno poderia ter efeito não só na ação do antígeno sobre o complemento como também sobre a reação.

Experimentamos três métodos de dispersão e consistem no seguinte:

MÉTODO I: — A solução do antígeno em benzeno é evaporada e o resíduo suspenso em salina. A lecitina é juntada a solução benzênica. É o método utilizado por WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN.

A inconveniência desse método é a suspensão em salina, de um resíduo de difícil solubilidade; o grau de dispersão poderá variar.

MÉTODO II: — A solução alcoólica de lecitina é pipetada em um copo e a solução salina do antígeno é vertida sobre a lecitina. A mistura é feita passando a suspensão de um a outro copo, várias vezes. Esse método é facilmente reproduzível, pois se assemelha ao empregado em cardioliipina.

MÉTODO III: — A mistura preparada pelo MÉTODO II foi precipitada com acetona (igual volume); o precipitado é lavado em acetona e seco. Juntar água destilada e aquecer para melhor solução. Isotonisar com NaCl.

O antígeno HA-5 solúvel em piridina e lecitinado por cada um dos métodos apresentou a seguinte turvação lida em KLETT, com filtro azul: Método I = 259; Método II = 230; Método III = 279.

Os antígenos foram experimentados em soro de lepra, filtrados ou não. A filtração foi sugerida para remover certos aglomerados insolúveis. Os resultados constam dos Protocolos X — XI e XII e Gráficos 16, 17 e 18).

Os resultados mostram a superioridade do Método II. A comparação entre antígenos lecitinados pelo Método II, antes e depois de filtrados, indica que a filtração em papel faz baixar o poder antigênico, quer em dosagens de soro quer em titulagens de antígeno (Protocolo XII, Gráfico 18).

PROTOCOLO X

INFLUÊNCIA DO MODO DE SE JUNTAR LECITINA EM ANTÍGENOS
NÃO FILTRADOS. (Gráfico 16)

COMPLE- MENTO	ml de antígeno HA-5 x 10 ⁻³									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
	ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO I									
3 U	35	40	40	40	40	45	45	35	20	50
6 U	50	45	50	45	70	55	60	65	80	100
9 U	55	55	60	65	70	90	95	100	100	100
12 U	55	75	85	90	95	100	100	100	100	100
2 U	35	30	50	65	60	70	80	80	85	85
3 U	75	95	95	100	100	100	100	100	100	100

ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO II

3 U	20	15	10	15	15	10	10	15	15	55
6 U	10	10	10	10	10	10	15	20	80	100
9 U	20	20	20	20	25	20	40	85	100	100
12 U	25	20	25	25	25	30	90	100	100	100
2 U	70	70	75	70	75	70	80	75	85	75
3 U	75	70	70	75	85	80	90	95	100	100

ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO III

3 U	70	60	60	65	50	50	35	40	45	50
6 U	85	70	75	80	75	75	80	85	90	100
9 U	100	85	90	85	95	100	100	100	100	100
12 U	100	90	95	100	100	100	100	100	100	100
2 U	75	55	65	70	70	70	80	85	75	80
3 U	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO (111254) COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	3 U	
15	70	95	95	100	100	0%

OBSERVAÇÃO: — As quantidades de sôro empregadas nas reações com 3, 6, 9 e 12 unidades de complemento, foram respectivamente de 0,0015, 0,0030, 0,0040 e 0,0055, correspondentes às diluições de 1:33,3, 1:16,7, 1:12,5 e 1:9.

PROTOCOLO XI

INFLUÊNCIA DO MODO DE SE JUNTAR LECITINA A ANTÍGENOS SOLÚVEIS
EM PIRIDINA E EM BENZOL E FILTRADOS EM PAPEL (Gráfico 17)

COMPLE- MENTO	ANTÍGENO HA-5 FILTRADO $ml \times 10^{-3}$									
	ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO I									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
3 U	80	80	80	75	75	75	70	75	80	80
6 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 U	80	75	80	85	90	90	85	90	90	90

ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO II

3 U	25	25	30	25	25	30	40	40	40	70
6 U	30	35	40	40	55	60	80	85	100	100
9 U	50	55	60	65	75	100	100	100	100	100
12 U	60	55	55	70	75	90	100	100	100	100
2 U	75	75	75	80	75	65	75	80	90	90

ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO III

3 U	70	80	65	75	75	80	70	70	75	80
6 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 U	90	90	85	80	95	90	90	95	100	100

CONTRÔLES:

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	3 U	
15	80	100	45	100	100	0%

OBSERVAÇÃO: — foram usadas as mesmas diluições do sôro 111254, do Protocolo X. As condições da experiência foram as mesmas que descritas no Protocolo X.

Os resultados das titulações (Protocolos X e XI) são apresentados no Gráfico 17.

PROTOCOLO XII

EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE LECITINA SÔBRE A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM SÔRO DE LEPRA N. 111254 (Gráfico 18).

COMPLE- MENTO	ml DE ANTÍGENO HA-5 x 10 ⁻³									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
	ANTÍGENO LECITINADO A 0,025% (MÉTOD0 II)									
3 U	35	40	35	35	35	35	50	45	50	60
6 U	30	30	30	55	55	60	80	80	100	100
9 U	50	50	60	55	60	70	95	95	100	100
12 U	45	55	55	60	70	70	100	100	100	100
2 U	50	60	55	50	50	45	55	70	80	80

ANTÍGENO LECITINADO A 0,050% (MÉTOD0 II)

3 U	35	30	30	35	30	40	45	45	50	60
6 U	50	50	60	50	65	80	90	100	100	100
9 U	50	50	70	70	75	80	95	100	100	100
12 U	50	55	60	60	65	75	100	100	100	100
2 U	35	30	35	35	35	40	50	55	50	55

ANTÍGENO LECITINADO A 0,075%.: (MÉTOD0 II)

3 U	35	30	40	40	35	40	40	45	55	60
6 U	55	60	70	70	85	80	95	100	100	100
9 U	75	75	75	85	85	90	95	100	100	100
12 U	75	70	80	75	85	90	100	100	100	100
2 U	35	30	30	40	35	35	40	45	45	55

ANTÍGENO W. K. K. + 0,05% DE LECITINA (MÉTOD0 II)

3 U	45	45	50	50	55	60	70	80	80	85
6 U	70	85	90	85	100	100	100	100	100	100
9 U	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12 U	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 U	40	45	45	50	45	50	45	60	55	55

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	3 U	
15	60	100	45	100	100	0%

O sôro 111254 foi diluído a 1:33, 1:16,7, 1:12,5 e 1:9 para as reações com 3, 6, 9 e 12 unidades de complemento, respectivamente.

GRÁFICO 16

Influência do modo de se juntar íscitina ao antígeno solúvel em piridina, não filtrado, sobre a reação de fixação do complemento com soro de lepra (Protocolo X).

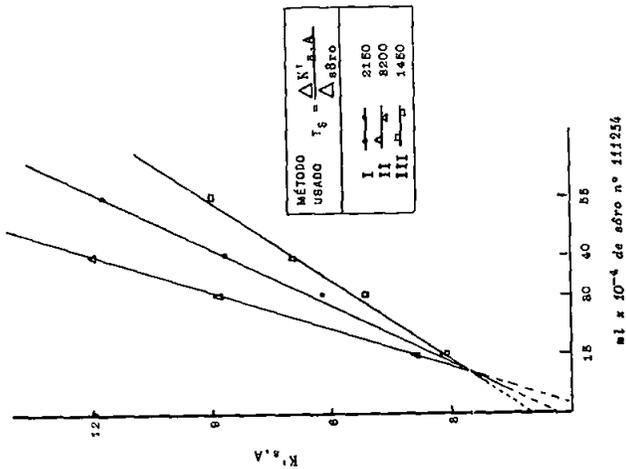


GRÁFICO 17

Comparação entre antígenos filtrados e não filtrados, iectinados pelo método II, a 0,05% (Protocolos X e XI).

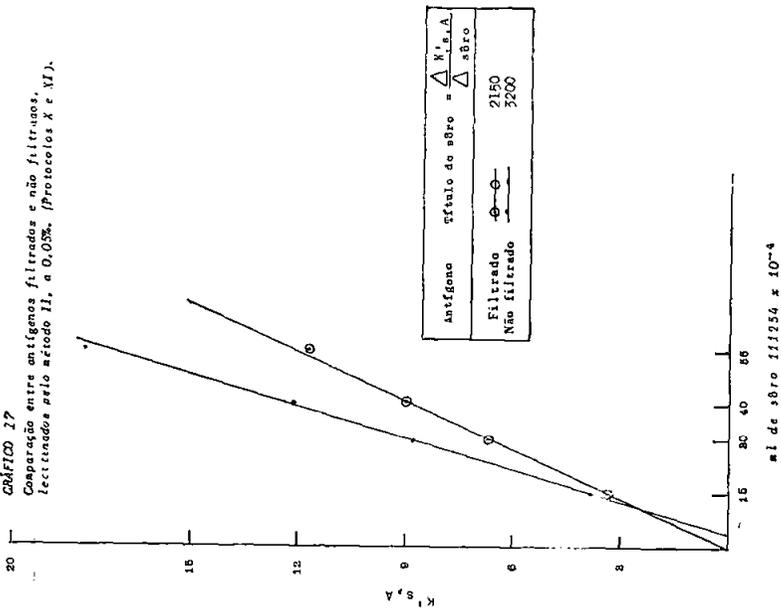
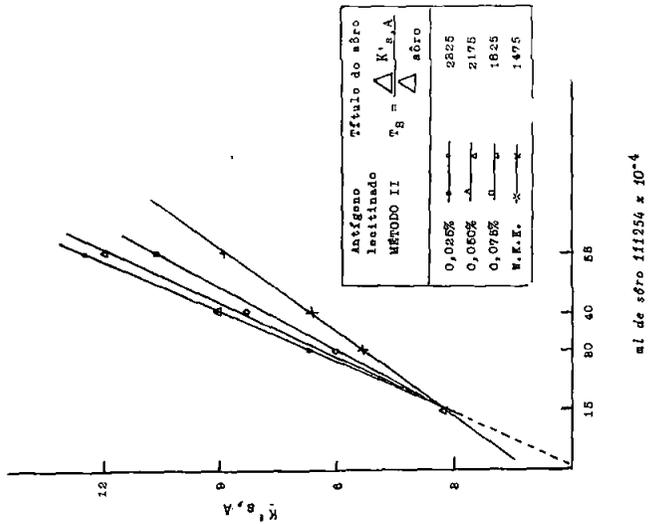


GRÁFICO 18
Efeito da quantidade de lecitina em antígenos solúveis em piridina em reações com soro de lepra (Protocolo XII)



EFEITO DA QUANTIDADE DE LECITINA

Doses variáveis de lecitina foram juntadas ao antígeno solúvel em piridina HA-5, pelo Método II. Para comparação foi também empregado o antígeno W. K. K. com 0,05% de lecitina, porém lecitinado pelo Método I.

Os resultados obtidos constam do Protocolo XII; o Gráfico 18 mostra que as doses de 0,025 e 0,050% de lecitina são nitidamente superiores à quantidade de 0,075%, segundo a reação, de maior inclinação da linha de regressão soro-complemento. O antígeno de W. K. K. deu título menor ao soro.

A comparação entre os dois antígenos, HA-5 e W. K. K. lecitinados pelo Método II, indicou que o antígeno HA-5 tinha maior capacidade de reação. Julgados pelo mesmo critério, os títulos dos antígenos foram 6000 e 3241 respectivamente para os antígenos HA-5 e W. K. K. (Protocolo XIII, Gráfico 19).

Quantidades maiores que 0,05 de lecitina diminuíram a intensidade da reação. O Protocolo XIV e Gráfico 20 mostram a titulação de um soro de lepra (n.º 111) com um mesmo antígeno (HA-5) lecitinado pelo Método II, a 0,05%, 0,10% e 0,15%.

Os títulos encontrados foram respectivamente: 118, 75 e 49.

Com outro soro a influência da quantidade de lecitina sobre o título não foi tão marcada, embora se pudesse verificar que a dose ótima de lecitina estava em redor de 0,05 por cento (Protocolo XV e Gráfico 21).

O Gráfico 21 ilustra uma dosagem de antígeno, diversamente lecitinado. Observar o alto valor de a que depende da quantidade de soro presente, como vimos anteriormente ao tratarmos do ramo vertical das curvas de isofixação em lepra.

PROTOCOLO XIII

COMPARAÇÃO DE DOSAGENS DE ANTÍGENOS LECITINADOS PELO MÉTODO II
(Gráfico 19)

COMPLE- MENTO	ml DE ANTÍGENO x 10 ⁻⁴ (HA-5 + 0,05% DE LECITINA)									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
3 U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
6 U	0	0	0	0	0	0	10	25	55	100
9 U	0	0	0	15	25	55	85	100	100	100
12 U	15	20	35	75	100	100	100	100	100	100
2 U	65	60	55	45	50	50	60	65	55	55
3 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ANTÍGENO W. K. K. + 0,05% DE LECITINA

3 U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
6 U	0	0	0	0	0	15	35	55	85	100
9 U	15	25	55	65	100	100	100	100	100	100
12 U	60	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 U	35	35	45	40	40	40	45	45	55	55
3 U	85	80	80	95	90	100	100	100	100	100

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO COM:		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	
15	85	100	55	100	0%

Antígeno diluído em salina boratada. Reação feita em presença de 0,05 ml de sôro de lepra 111254 não diluído.
Incubação preliminar: 90 minutos a 37°C
Incubação de hemólise: 15 minutos a 37°C

PROTOCOLO XIV

EFEITO DA LECITINA SÔBRE OS TÍTULOS DE SÔRO DE LEPRÁ n.º 111 (Gráfico 20)

COMPLE- MENTO	ml DE ANTÍGENO X 10 ⁻³									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
	HA-5 + 0,05% DE LECITINA									
3 U	35	35	35	30	30	35	35	55	50	60
6 U	40	40	35	50	50	50	60	70	90	100
9 U	35	40	40	40	55	70	80	100	100	100
12 U	30	35	30	30	30	35	40	60	90	100
2 U	45	40	35	35	35	30	35	35	40	50

HÁ-5 + 0,10% DE LECITINA

3 U	35	35	30	30	35	30	40	40	45	55
6 U	70	70	75	75	80	80	95	100	100	100
9 U	80	75	90	90	95	95	95	100	100	100
12 U	85	90	85	85	100	100	100	100	100	100
2 U	30	35	40	40	35	35	35	40	30	35

HA-5 + 0,15% DE LECITINA

3 U	50	35	35	30	35	35	35	45	50	50
6 U	85	85	90	85	90	95	100	100	100	100
9 U	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 U	50	35	30	35	35	35	45	50	50	50

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	3 U	
10	75	100	40	100	100	0%

OBSERVAÇÃO: as quantidades de soro n.º 111 utilizadas nas reações com três, seis, nove e doze unidades de complemento foram 0,0015, 0,0030, 0,0040 e 0,0055 ml.

GRÁFICO 20

Efeito da concentração de lecitina no antígeno sobre o título do soro (Protocolo XIV).

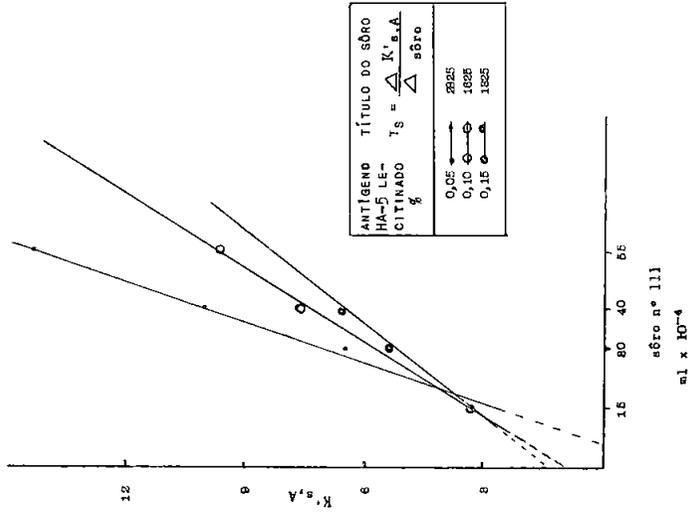
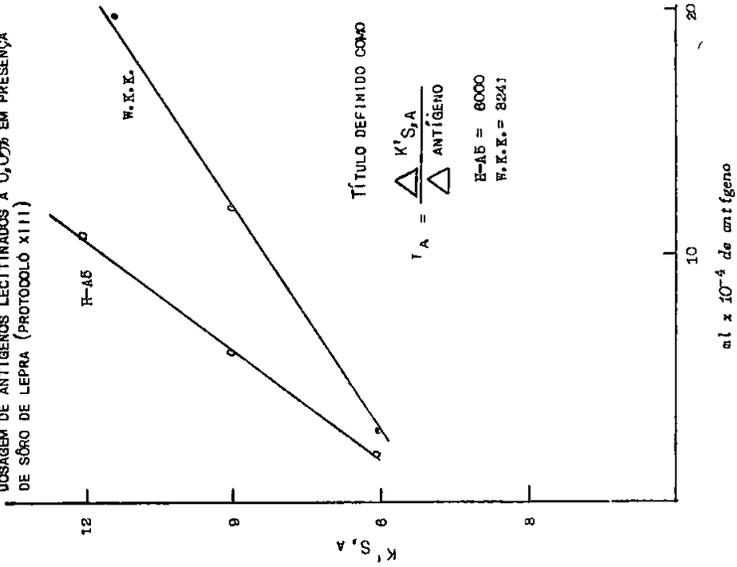


GRÁFICO 19
 DOSAGEM DE ANTÍGENOS LECITINADOS A 0,05% EM PRESENÇA DE SORO DE LEPRO (PROTÓCOLO XIII)



PROTOCOLO XV

INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE LECITINA NA DOSAGEM DO ANTÍGENO HA-5,
EM PRESENÇA DE SÔRO DE LEPRA 1112.

	ml DE ANTÍGENO X 10 ⁻⁴									
	16	12	10	8	6	4	3	2	1	0,5
	HA-5 + 0,05% DE LECITINA									
3 U	0	0	0	0	0	0	0	0	15	50
6 U	0	0	0	0	0	10	50	70	90	100
9 U	0	0	0	20	50	80	100	100	100	100
12 U	15	20	35	65	100	100	100	100	100	100
2 U	35	30	25	40	40	40	35	35	40	30

HA-5 + 0,10% DE LECITINA

3 U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
6 U	0	0	0	0	0	30	50	80	100	100
9 U	0	0	15	35	70	90	100	100	100	100
12 U	15	25	50	65	80	90	100	100	100	100
2 U	20	25	25	20	25	30	35	30	30	35

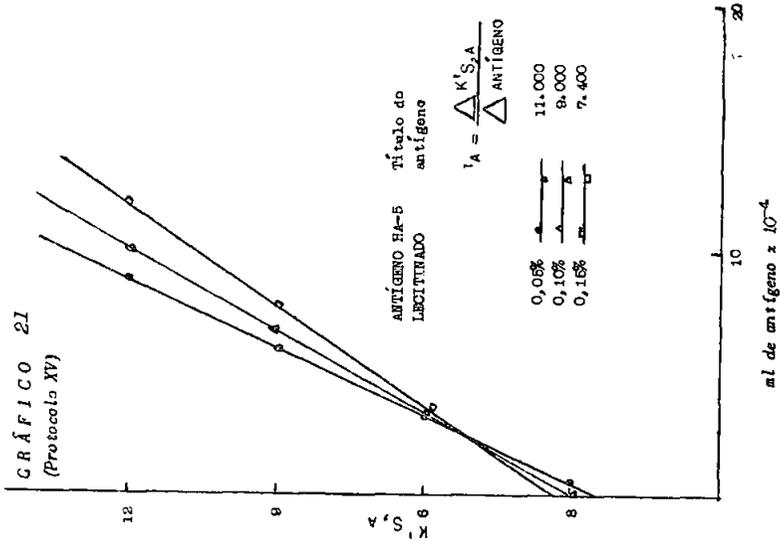
HA-5 + 0,15% DE LECITINA

3 U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
6 U	0	0	5	15	25	40	55	70	90	90
9 U	20	30	35	55	70	85	90	100	100	100
12 U	30	45	60	75	90	100	100	100	100	100
2 U	20	25	30	35	30	30	30	35	35	35

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	3 U	
10	75	100	40	100	100	0%

No Gráfico 21 são projetadas as quantidades de antígeno necessárias para 50% de hemólise quando soro não diluído está presente com três, seis, nove e doze unidades de complemento.



COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS

No Protocolo XVI, apresentamos reações feitas com 5 preparados antigênicos. Observamos nítido efeito zonal com os antígenos aquosos; os antígenos preparados por extração com água, álcool e éter ou pelo método de W. K. K. não mostraram o efeito de zona. O antígeno de WITEBSKY não só é menos anti-complementar como mais antigênico. O antígeno aquoso extraído pela mistura água, álcool e éter (HMC-27) possui a mesma atividade que o antígeno aquoso preparado por extração a quente do bacilo da tuberculose.

O método de extração parece ser o responsável pelo comportamento dos diversos antígenos, pois foram todos preparados do mesmo lote de células.

O Protocolo XVII mostra uma série paralela de reações. O antígeno W. K. K. foi preparado segundo o método de WITEB SKY ET AL. porém a extração dos bacilos foi feita com a mistura álcool-éter-água. Fraca atividade antigênica mostra ser o método desaconselhável, pois provas anteriores (Protocolo XVI) indicaram ser o antígeno W. K. K. preparado de bacilos do lote TB 48189, bastante ativo. O antígeno aquoso HA-SAA preparado por precipitação ácida em acetona, era ativo mas anticomplementar. Marcada diferença em comportamento foi observada tratando o antígeno aquoso 28 (OB), preparado por ebulição dos bacilos em água destilada, pela piridina. A parte solúvel em piridina possuía atividade antigênica comparável ao antígeno W. K. K. porém a parte insolúvel não só era desprovida de ação antigênica, como mostrava o efeito zonal da propriedade anticomplementar.

Diferente proporção entre água, álcool e éter, não afeta o comportamento do antígeno (antígeno BWA, Protocolo XVIII; a mistura dos solventes era ainda capaz de extrair os princípios antigênicos de bacilos previamente extraídos com água fervente; sua atividade antigênica era praticamente a mesma que a dos antígenos preparados de células simplesmente tratadas pela acetona; no entanto sua atividade anticomplementar era menor, não apresentando o efeito zonal.

Quando no entanto extraímos bacilos com álcool-água-éter, as células já não são material rico de antígenos, mesmo quando se emprega o método de WITEBSKY (Protocolo XVII).

PROTOCOLO XVI

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS

DIL.	ANTÍGENOS														
	HMC-27			W. K. K. sem lecitina			W. K. K. + lecitina			28 (OB) total			28 (OB) reprecip.		
	2	3	6	2	3	6	2	3	6	2	3	6	2	3	6
	UNIDADES DE COMPLEMENTO														
1	0	0	85	0	85	0	55	65	0	0	40	85	20	80	60
1,67	0	10	80	85	0	85	90	0	0	0	85	60	35	85	25
5,9	15	20	75	80	0	65	100	0	0	25	65	10	60	100	0
10	15	25	65	80	0	65	100	0	0	40	75	0	60	100	0
16,7	15	50	45	80	0	60	100	0	0	45	85	20	60	100	0
50	40	100	60	100	70	60	100	20	75	100	100	100	65	100	100
100	75	100	70	100	100	60	100	45	75	100	100	100	65	100	100
167	70	100	70	100	100	60	100	85	80	100	100	100	70	100	100
500	80	100	85	100	100	65	100	100	80	100	100	100	70	100	100

CONTRÓLES

	DO COMPLEMENTO COM:			DO SORO COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
	1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	3 U	
15	80	100	100	55	100	100	0%

Antígenos experimentados:

HMC-27 = Extração com mistura água (10), álcool (5) e éter (3); precipitação pela acetona. O pp. é diluído em água e re-precipitado pela acetona e NaCl. Essa precipitação é repetida várias vezes. O antígeno é então diluído em água e centrifugado a 5.000 rpm. por 1 hora. Isotonisar.

28 (OB) = É o antígeno aquoso, extraído por ebulição em água a (total) 100°C, de bacilos previamente tratados pela acetona. É o extrato total, como descrito em capítulo II. 28 (OB) = É o antígeno 28 (OB) reprecipitado e purificado como (repp) descrito em capítulo II.

W. K. K. = É o antígeno de WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN, preparado das mesmas células (lote Tb 48189).

OBSERVAÇÃO: Os tubos com 2 e 3 unidades de complemento são os contróles do antígeno. O tubo reação é feito com 6 unidades de complemento.

PROTOCOLO XVII

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS EM TESTES COM 8 UNIDADES DE COMPLEMENTO

DIL. 1:	ANTÍGENOS											
	W. K. K.-AP			HA-5-AA			28 (OB)-S			28 (OB)-1		
	UNIDADES DE COMPLEMENTO											
	2	3	6	2	3	6	2	3	6	2	3	6
1	0	0	15	0	10	0	35	95	0	85	100	100
1,67	0	15	20	0	10	0	35	85	0	85	100	100
5,0	25	70	30	0	10	0	30	85	0	75	100	80
10	30	90	20	0	15	0	35	95	0	80	80	55
16,7	25	90	15	0	15	0	35	100	30	60	100	85
50	35	100	15	15	55	0	40	100	100	45	100	100
100	45	100	90	25	100	20	50	100	100	60	100	100
167	35	100	100	25	100	20	50	100	100	60	100	100
500	60	100	100	30	100	100						

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO 322 DIL. A 1:5 EM SÔRO NEGATIVO		DAS HEMACIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	
15	80	100	45	100	0%

Os tubos com 2 e 3 unidades contém complemento e antígeno e correspondem ao controle do poder anticomplementar do antígeno.

ANTÍGENOS EXPERIMENTADOS:

W. K. K.-AP: É o antígeno W. K. K. preparado com material obtido após a extração dos bacilos com a mistura álcool-éter-água.

HA-5-AA: É o antígeno aquoso precipitado por acetona em meio ácido. Bacilos extraídos com a mistura álcool, éter, água.

28(OB): É o extrato aquoso obtido por extração em água fervente. Precipitado pela acetona e o precipitado tratado pela piridina. A parte solúvel é 28(OB)-S.

28(OB)-1 É o antígeno como preparado anteriormente, porém é a parte insolúvel em piridina.

Todos os antígenos foram lecitinados a 0,05 pelo método II.

PROTOCOLO XVIII

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS EM TESTES COM 6 UNIDADES DE COMPLEMENTO

DIL.	ANTÍGENOS											
	BWA-28			HA5-WA			WKK-A			WKK-P		
	UNIDADES DE COMPLEMENTO											
1:	2	3	6	2	3	6	2	3	6	2	3	6
1	20	70	0	0	30	0	0	0	0	0	10	0
1,67	20	80	0	0	30	0	0	0	0	0	15	0
5,0	20	75	0	0	30	0	25	60	0	20	65	0
10	30	80	0	0	20	0	30	70	0	20	75	0
16,7	30	85	0	15	40	0	30	95	0	30	90	0
50	45	90	0	35	95	0	70	100	0	65	100	0
100	50	100	15	50	100	75	65	100	85	40	100	55
167	60	100	100	85	100	100	60	100	100	45	100	100
500	70	100	100	75	100	100	60	100	100	60	100	100

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO 322 DIL. A 1:5 EM SÔRO NEGATIVO		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	
10	85	100	55	100	0%

O antígeno foi diluído em solução salina boratada.

ANTÍGENOS EXPERIMENTADOS:

BWA-28 É o extrato com água, álcool, éter de bacilos previamente extraídos duas vezes com água fervente por uma hora.

HA5-WA É um extrato semelhante preparado de bacilos, antes da fervura com água.

WKK-A É o antígeno de WITEBSEY, sem lecitina.

WKK-P É a parte solúvel em piridina, mas reprecipitada várias vezes pela acetona e cloreto de sódio.

O soro de lepra n.º 322 foi empregado na quantidade de 0,05 ml da diluição a 1:5 em soro humano negativo.

Os tubos com 2 e 3 unidades de complemento correspondem ao controle da ação anti-complementar do antígeno.

FATÔRES DE CONVERSÃO PARA O SISTEMA LEPRO. DEFINIÇÃO DE h DA RELAÇÃO LOGÍSTICA DE VON KROGH. DEPENDÊNCIA DA PERCENTAGEM DE COMPLEMENTO FIXADO.

Quando um novo sistema é padronizado pela técnica quantitativa de fixação do complemento de WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, é necessário ter o conhecimento do comportamento de grande número de soros com o antígeno estudado, em relação não só à capacidade fixadora mas também em relação ao modo como a reação se processa.

Os protocolos apresentados e a nossa experiência acumulada sugerem ser possível o emprêgo de uma dose única de antígeno "a dose de reatividade paralela" para reações com três, seis, nove e doze unidades de complemento.

As curvas de isofixação sendo praticamente assíntotas ao eixo do antígeno, permite o uso de uma dose não crítica de antígeno, em excesso. Essa quantidade de antígeno produzirá reações máximas com as doses de complemento empregadas, desde que soro seja diluído convenientemente.

Se então tomarmos antígeno e sôro nas quantidades capazes de dar uma reação máxima e variarmos as quantidades de complemento presente inicialmente na reação, as hemólises resultantes traçarão uma curva sigmóide característica, quando se projeta complemento contra hemólise.

Essa curva sigmóide de resposta poderá ser retificada em papel logito de hemólise-logaritmo de complemento: a linha de regressão assim traçada poderá ser estudada para a determinação dos seus parâmetros.

O método sendo repetido em numerosos soros de casos clínicos bem estudados nos dará a informação desejada: o valor médio dos parâmetros para a reação de fixação de complemento quantitativa em lepra.

Se x é o número de unidades de complemento usado em um determinado tubo de reação e y o grau de hemólise observada, a relação entre x e y é dada pela relação de von KROGH (1916) :

$$\log x = \log K + h \cdot \log \left(\frac{y}{1-y} \right)$$

onde h e K são parâmetros

(h é empregado em vez de $1/n$ de von KROGH.)

Quando a hemólise é de 50% ($y = 0,5$), $x = K$, isto é: K representa o número de unidades de complemento necessárias para 50% de hemólise e toma designações diferentes segundo as condições em que o teste é feito. Assim na dosagem de complemento em presença de solução salina e sem incubação preliminar a quantidade de complemento necessária para 50% de hemólise é considerada "uma unidade de complemento" e designada por K_0 , segundo a nomenclatura proposta por THOMPSON ET AL. (1949).

O número de unidades de complemento necessárias para 50% de hemólise em presença de antígeno e anticorpo e depois de incubação preliminar é designada por $K'_{S,A}$, $K'_{s,A}$ ou $K'_{S,a}$ conforme as proporções relativas entre sôro e antígeno.

A outra constante paramétrica da linha de regressão é a sua inclinação h que é determinada como o quociente:

$$h = \frac{\Delta \log x}{\Delta \text{logito } y}$$

Num mesmo sistema, as linhas de regressão traçadas para diferentes quantidades de complexo antígeno-anticorpo, podem ser paralelas ou não.

Se são paralelas um único valor de h servirá para o cálculo da quantidade de complemento necessária para 50% de hemólise, sendo conhecido o número de unidades de complemento inicialmente presente e a hemólise resultante.

Em outros sistemas (sífilis e tuberculose) não existe paralelismo entre as linhas de regressão, sendo que as suas inclinações dependem da quantidade de complemento

$$h = f(K')$$

A determinação de K' poderá ser feita grãficamente se conhecermos dois pontos:

$$(x_1 \ y_1) \text{ e } (x_2 \ y_2)$$

obtidos experimentalmente, quando sujeitamos o mesmo complexo fixador à duas quantidades de complemento, x_1 e x_2 .

Os dois pontos estarão sôbre uma reta que cortará a abcissa 50% de hemólise, determinando no eixo das ordenadas o log de K'.

Para que a técnica de fixação do complemento possa ser praticada em grande número de soros é necessário que a determinação de K' possa se fazer por um único ponto de hemólise parcial, facilmente obtido com poucas diluições de sôro. Nessas condições é necessário se ter o conhecimento do valor de h para o sistema em teste. Êsse valor de h seria a média dos valores obtidos em uma série de titulações nas quais se mantinham constantes tôdas as condições (volume, temperatura, concentração de antígeno, número de unidades de complemento) variando apenas o sôro.

Se a reação fôr feita com x unidades de complemento o conhecimento de h nos permitiria resolver o seguinte problema:

Se com x unidades de complemento, a hemólise foi de y, quantas unidades serão necessárias para 50% de hemólise?

Conhecido o valor de h para estipuladas condições e para um mesmo sistema de fixação do complemento, é possível a construção de tabelas que nos dão diretamente a quantidade de complemento necessária para 50% de hemólise,

A determinação dêsses "fatores de conversão" se faz sujeitando o mesmo complexo antígeno-anticorpo à diferentes quantidades de complemento. O complemento que sobra da fixação havida produzirá certo grau de hemólise. As hemólises obtidas descrevem uma linha sigmóide de resposta, que retificada por projeção logito-logarítmo, nos permite o cálculo do valor de h, para o sistema em experiência.

Os valores de h variam de sistema para sistema e no mesmo sistema, segundo as condições da incubação preliminar, a quantidade de complemento inicialmente presente e também do tempo durante o qual a hemólise se processa. Dessa forma torna-se necessário levantar tabelas de fatores de conversão para cada uma das quantidades de complemento utilizadas, a partir de valores médios de h obtidos em uma série de dosagens feitas exatamente nas mesmas condições, com soros diferentes.

Esta é a parte mais trabalhosa da técnica de W. M. M. exigindo numerosas dosagens e grande cuidado no cômputo dos dados obtidos. No entanto, uma vez preparadas as tabelas para um determinado sistema, o trabalho necessário para se fazer uma reação é pouco, pois a adição de hemácias sensibilizadas diretamente ao tubo de reação permite conhecer, pela hemólise resultante, qual a quantidade de complemento que seria necessária para 50% de hemólise, calculando-se o título com o dado obtido.

Como a quantidade de complemento é sempre calculada por extrapolação, por meio da função logística de von KROGH, o conhecimento de h para cada um dos sistemas de fixação do complemento (sífilis, tuberculose, lepra etc.) assume importância capital na determinação do título do sôro pela técnica quantitativa de W. M. M.

A técnica quantitativa de fixação do complemento proposta por MAYER, OSLER, BIER e HEIDELBERGER (1948) exige a dosagem do complemento depois da incubação preliminar, para a determinação da quantidade de complemento livre. A quantidade de complemento empregada por esses autores é em excesso relativo à concentração do complexo antígeno anticorpo a ser formado. As curvas de dosagem do complemento livre mostram um valor de h em redor de 0,20, para diferentes sistemas investigados. O uso de uma única tabela de fatores de conversão, contribuiria para a simplificação e padronização da técnica quantitativa de fixação do complemento.

A diferença entre a técnica de W. M. M. e a de MAYER ET AL. é essencialmente a seguinte: na técnica W. M. M. a fixação do complemento vai de 48% à 93,5% respectivamente com 3 e 12 unidades de complemento; na de MAYER ET AL. a fixação é de 50% do complemento inicialmente presente.

Enquanto na técnica de ALBANY (técnica de W. M. M.) se exige que uma unidade de complemento seja deixada livre para hemólise de 50%, no método de MAYER qualquer quantidade pode sobrar, pois a titulação do complemento evidenciará por diferença, a quantidade de complemento fixado.

Anteriormente, definimos h segundo as duas escolas de fixação de complemento. Para W. M. M. h se refere à inclinação da linha de regressão logaritmo de *complemento inicialmente presente* contra logito de hemólise; para MAYER ET AL., h toma o significado original dado por von KROGH (1916), como a inclinação de uma linha de regressão obtida projetando *volumes de* mistura sôro, antígeno e complemento, contra logitos de hemólise.

Enquanto a primeira faz a dosagem do complemento em presença de quantidade constante de complexo fixador do complemento, a segunda faz a dosagem de complemento, diluindo uma mistura de complexo fixador com complemento.

Dêsse modo não há senso em se comparar a técnica de W. M. M. com aquela descrita por MAYER ET AL. dizendo que na primeira os valores de h são variáveis, enquanto na segunda apresentam um valor constante para todos os sistemas.

Quando quantidades variáveis de complemento reagem com um mesmo complexo antígeno-anticorpo, as hemólises produzidas pelo complemento deixado livre descrevem uma linha sigmóide, que retificada nos deu um valor de 0,08 para h (Protocolo XIX), e $K'_{s,A} = 10,7$ unidades. (Técnica de W. M. M.).

Se no entanto em tubos duplicados e em volumes maiores, em vez de adicionarmos hemácias sensibilizadas diretamente ao tubo reação, fizemos a dosagem do complemento residual (técnica de MAYER ET AL.), obteremos diversas curvas hemolíticas das quais podem ser calculados os valores de h e da quantidade de complemento fixado. O Quadro V mostra os valores encontrados, utilizando sôro de lepra e antígeno HA-5 lecitinado a 0,05%.

QUADRO V

VALORES DE h EM FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO NO SISTEMA LEPPRA. QUANDO O MESMO COMPLEXO IMUNE REAGE COM DIFERENTES QUANTIDADES DE COMPORTAMENTO

TUBO	UNIDADES DE COMPLEMENTO				
	PRE-SENTES	LIVRES	FIXADAS	FIXAÇÃO %	H V
1	12,2	3,0	9,2	76	0,24
2	11,4	2,3	9,1	80	0,27
3	10,7	1,9	8,8	82	0,28
4	10,0	1,3	8,7	87	0,29
5	9,3	0,94	8,4	90	0,37
6	8,8	0,61	8,2	93	0,40

Verificamos que em cada tubo de reação contendo a mesma quantidade de complexo antígeno-anticorpo, a fixação do complemento se processa de acôrdo com a quantidade de complemento inicialmente presente. Com maiores quantidades de complemento a fixação é maior em número de unidades, porém a proporção entre complemento fixado e o presente é cada vez menor (no Quadro V, observar que foi de 93% para 76%, respectivamente quando 8,8 e 12,2 unidades de complemento estavam inicialmente presentes).

O complemento residual pôde ser dosado e as curvas hemolíticas mostraram inclinações bastante diferentes, de 0,24 a 0,40. Pela técnica de MALTANER o valor de h foi de 0,08.

Os dados sugerem que para menor percentagem de fixação o valor de h tende para o normal de 0,2.

O complexo fixador alteraria quali e quantitativamente o complemento presente e essa alteração é tanto maior quando mais complemento é fixado. Quando há excesso relativo de complemento a alteração qualitativa, embora presente, não seria suficiente para alterar o valor de h_V , até uma fixação em redor de 50%. Quando há maior fixação, mesmo aplicando a técnica de MAYER ET AL. a alteração de h_V é evidente (ALMEIDA e SILVERSTEIN, 1955).

Quando se sujeita o mesmo complexo fixador à várias quantidades de complemento e se mede a hemólise produzida pelo complemento residual, diretamente acrescentando hemácias sensibilizadas à mistura-reação, apenas estamos fazendo a determinação de um ponto em uma curva hemolítica que é a da dosagem de complemento pela técnica de MAYER ET AL.

O Quadro VI mostra as hemólises parciais obtidas em uma série de 4 tubos (Protocolo XIX).

QUADRO VI

VALORES DE h_X E h_V EM PRESENÇA DA MESMA QUANTIDADE DE COMPLEXO FIXADOR E COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COMPLEMENTO.

TUBO N.º	HEMÓ- LISE %	UNIDADE DE COMPLEMENTO				
		PRE- SENTES	LIVRES	FIXADAS	H X	H V
3	90	10,7	1,9	8,8	0,08	0,28
4	70	10,0	1,3	8,7		0,29
5	45	9,3	0,94	8,4		0,37
6	20	8,8	0,61	8,2		0,40

A relação entre os dois valores de h_X e h_V pode melhor ser apreciada (no Gráfico 22) ao estudarmos o Protocolo XIX, descrito com todos os detalhes, em vista da aparente complexidade do assunto.

PROTOCOLO XIX

A experiência destina-se a mostrar nos mesmos tubos, ao mesmo tempo, o significado de h_X e de h_V , como definidos respectivamente por W. M. M. e por MAYER ET AL.

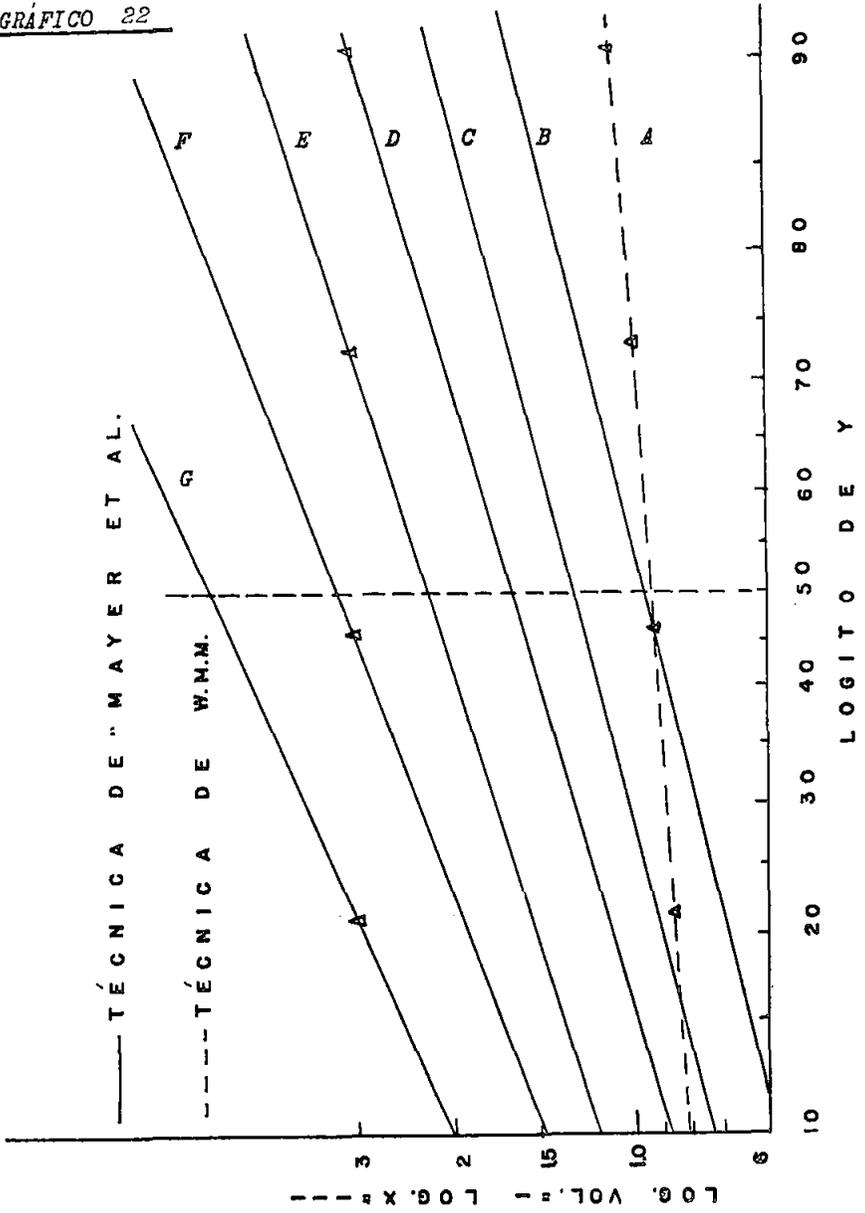
Em tubos de 15 por 150 mm foram misturados:

Antígeno HA-5 1:10	1,0 ml
Sôro 8954 dil. 1:25	0,5 ml
Complemento (*).....	1,0 ml
Sol. salina	0,5 ml

(*) Foram montados 6 tubos, com as seguintes quantidades de complemento: 12,2 — 11,4 — 10,7 — 10,0 — 9,3 e 8,8 unidades por 0,1 ml.

Foram mantidas as mesmas proporções utilizadas na técnica de W. M. M., assim como o volume relativo de cada um dos elementos previamente experimentados.

GRÁFICO 22



As curvas hemolíticas de B a G (Gráfico 22) obtidas pela projeção de logaritmos de volume da mistura antígeno, anticorpo e complemento, contra logitos de hemólise, possuem inclinação (h_V) de valores diferentes, tanto maiores quanto maior é a percentagem de fixação de complemento. Quando as condições da reação permitem sobrar complemento suficiente para toda a curva hemolítica, a determinação da quantidade de complemento livre pode ser feita diretamente (curvas B, C, D e F) ; outras vezes necessita ser calculada por extrapolação gráfica (curvas F e G).

Como acabamos de ver, não se pode comparar h_X com h_V pois são parâmetros de curvas traçadas em diferentes condições; h_X tem como numerador $\Delta \log$ de complemento inicialmente presente; h_V tem como numerador $\Delta \log$ do volume da mistura da reação que contém ainda complemento livre. Ambos os quocientes têm o mesmo denominador que é $\Delta \log$ de hemólise.

Em determinadas condições $h_X = h_V$. Nesse caso o observador tem que dar condições para que a fixação do complemento não vá além de 50% a 60%.

Dizer que a técnica de MAYER, OSLER, BIER e HEIDELBERGER (1948) se utiliza de uma grande quantidade de complemento é não dar ênfase ao seu caráter de exigir uma fixação de complemento em proporção que não altere a constante h_X do complemento. E realmente esse ponto que BIER, SIQUEIRA e FURLANETTO (1955) definem quando dizem *"além disso, condições foram estabelecidas para a manutenção de um valor constante para o expoente 1/n na equação de von KROGH, assim permitindo o uso de uma única tabela de fatores de conversão para o cálculo da atividade hemolítica de C."*

Já na técnica de W. M. M. outras condições são estabelecidas para deixar sempre livre uma unidade de complemento; como a técnica de W. M. M. emprega maiores quantidades de complemento que a técnica de MAYER ET AL. a fixação tem que ser levada a efeito em graus variados, de acordo com o número de unidades de complemento inicialmente presentes; assim quando a reação é feita com 12 unidades de complemento, a fixação tem de ser levada a efeito até consumir 11, ou seja cerca de 92%. Os valores de h_X são portanto alterados e os fatores de conversão pela técnica de W. M. M. são construídos para diferentes concentrações de complemento e para os diversos sistemas estudados.

FATÔRES DE CONVERSÃO PARA LEPROLOGIA

Utilizando a técnica descrita por W. M. M. (1938) e calculando os dados obtidas pelo método de THOMPSON e MALTANER, 1940, determinamos os fatores de conversão para o sistema lepra.

A Tabela I nos dá diretamente o valor de $K'_{s,A}$ quando se conhecem o número de unidades de complemento inicialmente presente e a hemólise resultante.

O Gráfico 23 ilustra um monograma construído segundo THOMPSON e MALTANER (1940).

Quando fazemos a determinação de h_X para obtermos valores médios a serem utilizados no cômputo dos fatores de conversão é de grande utilidade empregar uma série de diluições de complemento, formando uma série geométrica de concentrações. Na técnica de W. M. M. emprega-se o fator 0,9, isto é, cada tubo contém (tubo na ordem ascendente, tomando o mais concentrado como n.º 1) 0,9 do complemento contido no tubo anterior.

O cálculo de h_x pode ser feito por método gráfico, mas é preferível empregar o método dos quadrados mínimos.

Esse método pode ser facilmente aplicado aos dados experimentais, utilizando-se tabelas pré-construídas para a determinação dos parâmetros da linha de regressão logaritmo de complemento-logito de hemólise (ALMEIDA, 1957a).

Para o cálculo de h_x não precisamos mais que observações seriadas. A posição do tubo na série geométrica nos informa sobre a concentração do complemento, mas para efeito da determinação de h_x , se a posição não tem influência pois as diferenças entre os logaritmos das concentrações de complemento são constantes.

A aplicação do método dos quadrados mínimos para série geométrica de razão 0,9 é exemplificada no Quadro VIII, com os dados calculados por meio da Tabela II.

TABELA I

UNIDADES DE COMPLEMENTO ($K's_A$) NECESSÁRIAS PARA 50% DE HEMÓLISE, INDICADAS PELO GRAU DE HEMÓLISE OBTIDO QUANDO SE EMPREGAM AS SEGUINTE QUANTIDADES DE COMPLEMENTO:

HEMÓLISE %	CONTRÔLE DO SÔRO		REAÇÃO COM SÔRO E ANTÍGENO			
	1	2	3	6	9	12
10	1,42	2,66	3,95	8,9	19,0	29,0
15	1,32	2,52	3,70	7,9	13,9	21,0
20	1,26	2,42	3,61	7,4	12,1	18,0
25	1,21	2,34	3,40	7,0	11,2	15,5
30	1,15	2,24	3,30	6,7	10,5	14,3
35	1,10	2,20	3,20	6,5	10,0	13,6
40	1,07	2,14	3,14	6,3	9,8	13,0
45	1,04	2,08	3,08	6,2	9,4	12,5
50	1,00	2,00	3,00	6,0	9,0	12,0
55	0,96	1,94	2,94	5,8	8,7	11,7
60	0,92	1,88	2,86	5,7	8,4	11,3
65	0,88	1,83	2,80	5,5	8,2	10,9
70	0,84	1,76	2,72	5,4	7,9	10,6
75	0,79	1,70	2,64	5,2	7,6	10,3
80	0,73	1,63	2,56	5,1	7,3	9,9
85	0,66	1,53	2,42	4,9	7,0	9,6
90	0,57	1,42	2,26	4,7	6,6	9,0

OBSERVAÇÃO: Os valores de h_x médios para 1, 2, 3, 6, 9 e 12 unidades de complemento são respectivamente 0,176-0, 130-0, 126-0, 124-0, 146 e 0,180. Os dois primeiros foram determinados como contrôles do antígeno.

NOMOGRAMA DA FUNÇÃO

SISTEMA LEPRA

$$\text{LOG. K} = \text{LOG. X} - F(K) \cdot \text{LOG}(Y/1-Y)$$

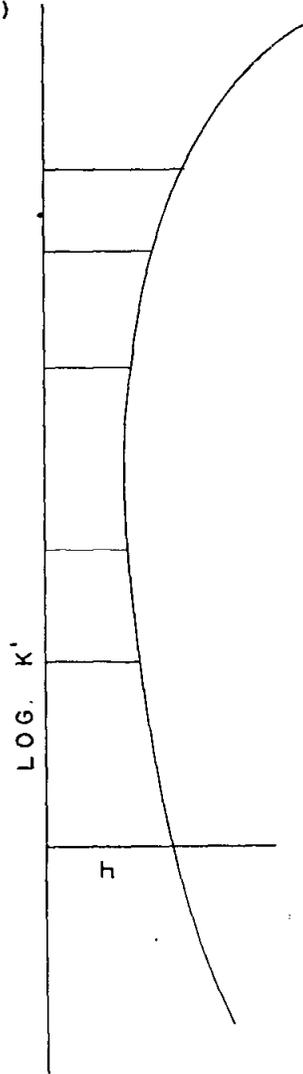
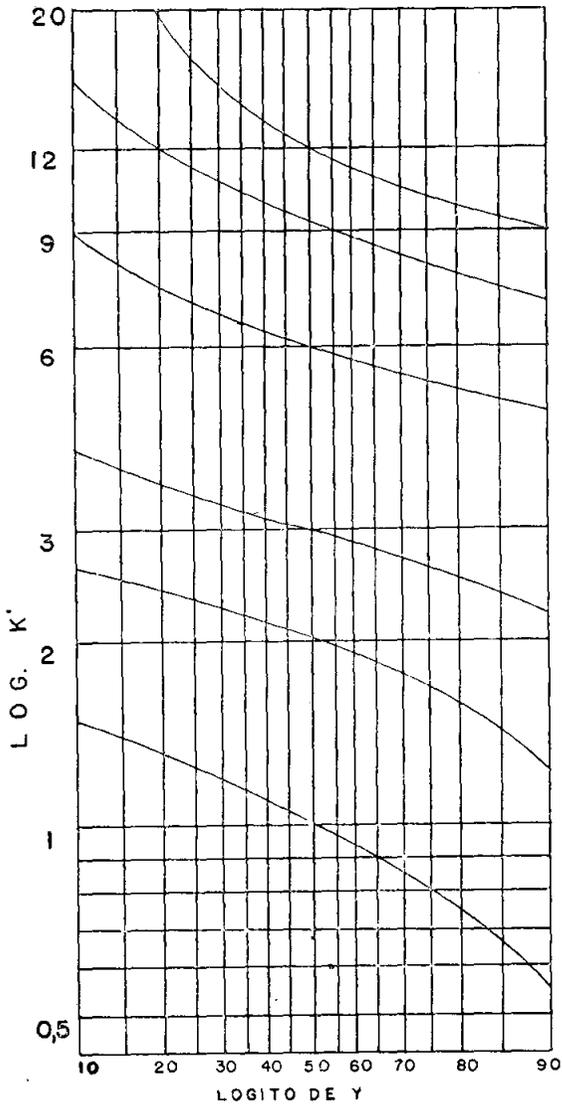


GRÁFICO 23

TABELA II
CÁLCULO DE X'Y' E Y' QUANDO X VARIA EM SÉRIE GEOMÉTRICA q = 0,9

Y'	X' (N.º DO TUBO EM SEQUÊNCIA NATURAL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	114	228	342	465	570	684	798	912	1026	1140
15	185	370	555	740	925	1110	1295	1480	1665	1850
20	238	476	714	952	1190	1428	1666	1904	2142	2380
25	282	564	846	1128	1410	1692	1974	2256	2538	2820
30	321	642	963	1284	1605	1926	2247	2568	2889	3210
35	355	710	1065	1420	1775	2130	2485	2840	3195	3550
40	388	776	1164	1552	1940	2328	2716	3104	3492	3880
45	419	838	1257	1676	2095	2514	2933	3352	3771	4190
50	450	900	1350	1800	2250	2700	3150	3600	4050	4500
55	481	962	1443	1924	2405	2886	3367	3848	4329	4810
60	512	1024	1536	2048	2560	3072	3584	4096	4608	5120
65	545	1090	1636	2180	2725	3270	3815	4360	4905	5450
70	579	1158	1737	2316	2895	3474	4053	4632	5211	5790
75	618	1236	1854	2472	3090	3708	4326	4944	5562	6180
80	662	1324	1986	2648	3310	3972	4634	5296	5958	6620
85	715	1430	2145	2860	3575	4290	5005	5720	6485	7150
90	786	1572	2358	3144	3930	4716	5502	6288	7074	7860

X' é o número do tubo menos uma constante arbitrária
de modo que os valores de X' são simplesmente
números de uma sequência natural
 $Y' = 351,9051677(1,2787536 + \log(y/1-y))$
 $a = \sum X'^2 - (\sum X')^2/N. = 16,10$
 $b = \sum X'/N$
N = número de observações (tubos) (segundo ALMEIDA (1957-a).)

a
-32,2
-80,5
-161,0
-281,75
-450,8
-676,2
-966,0
-1328,25

b
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
5,5

QUADRO VIII

NÚMERO DO TUBO DE COM- PLEMENTO	DETERMINAÇÃO DE H _x , EMPREGANDO A TABELA I		
	HEMÓLISE %	X'Y'	Y'
	Y	(T A B E L A I)	
1	65	545	545
2	55	962	481
3	25	846	282
4	15	740 +	185 +
N = 4 ENTÃO a = -80,8			b = 2,5 3093
			1493

Aplicando a fórmula:

$$h = \frac{a}{\sum X'Y' - b \sum Y'}$$

$$h = \frac{-80,5}{3093 - 2,5(1493)} = 0,126$$

ESTUDO COMPARATIVO DE ANTÍGENOS. MÉTODO DE ANÁLISE SEQUENCIAL PARA O SISTEMA LEPROSA.

O antígeno depois de preparado deve ser aferido com um outro tomado como padrão. A reprodução do antígeno é uma exigência para que resultados de reações de fixação de complemento possam ser reproduzidos e comparados.

O antígeno solúvel em piridina e em benzol apresenta, como vimos anteriormente, certas características que permitem torná-lo como "um antígeno padrão" pois não só apresenta propriedades específicas, como possui todos os requisitos de linearidade exigidos para sua aplicação nas reações quantitativas de fixação de complemento.

Para melhor padronização do sistema, seria de toda a conveniência conservar soros de pacientes cuidadosamente estudados. Os soros poderiam ser mantidos liofilizados, distribuídos em pequenos volumes.

Outros antígenos seriam comparados com o antígeno padrão; devem mostrar igual comportamento com os soros examinados, sendo permitida no entanto pequena discrepância, não maior que 16%. O problema consiste em fazer essa comparação com o menor número de reações e enfrentando pequeno e conhecido risco de aprovar ou rejeitar um antígeno, injustamente.

THOMPSON (1948) e MALTANER e THOMPSON (1948) desenvolveram métodos para serem aplicados no exame sorológico de antígenos à base de cardiolipina. O método, no entanto, pode ser aplicado com igual benefício a outros bioensaios, desde que sejam estipuladas as condições necessárias para a rejeição ou a aprovação de um antígeno e sejam construídas as tabelas necessárias para

o cômputo dos dados colhidos. Neste capítulo apresentamos o método que estamos usando na comparação de antígenos preparados de bacilo da tuberculose.

O método de análise que baseia no processo chamado de "inferência estatística", no qual não existe necessidade de planejamento inicial quanto ao número de observações a serem feitas; o método também não exige o conhecimento da forma de distribuição da frequência dos acontecimentos e daí ser chamado de método não paramétrico ou da distribuição livre (THOMPSON, 1949).

A decisão a ser tomada pelo observador depende em cada fase, dos resultados acumulados de observações previamente feitas; então decidirá se necessita de mais dados ou se com os que possui poderá tomar uma decisão, aceitando ou rejeitando um determinado antígeno. Sua decisão envolve sempre um certo risco que então foi tomado em consideração pelo matemático na construção das tabelas de análise seqüencial e que indicam o número de observações necessárias.

Um dos méritos do método de análise seqüencial aplicado para comprovar uma certa condição é exigir um número substancialmente menor de observações que o necessário para a mesma decisão com métodos baseados em um número pré-determinado de observações.

DEFINIÇÕES E CONCEITOS

Denomina-se *observação* um par de resultados de reações. Uma reação é feita com o antígeno padrão, a outra com o antígeno em prova. Todas as condições são mantidas constantes. O resultado pode ser dado em termos de "hemólise parcial", em títulos ou em *graus de reatividade*. Uma determinada observação deve ser inequivocamente classificada em:

Observação *defeituosa*, quando a discrepância entre os resultados é maior que 0,16 ($\Delta G \geq 0,070$). Observação *não defeituosa* quando a discrepância entre os resultados é menor que 0,16. ($\Delta G < 0,070$). Observação *inadmissível* quando uma decisão não pode ser feita ou por atipia da reação ou por evidente erro técnico.

FREQÜÊNCIA DE OBSERVAÇÕES NÃO DEFEITUOSAS

Seja n o número de observações (total), a defeituosas e b não defeituosas ($n=a+b$); a frequência de b é b/n . Podemos considerar que o total de n observações sejam parte de um universo U de observações e então definimos a relativa frequência das observações não defeituosas de U por Φ que na realidade um limite de b/n , quando n tende para o infinito.

Um valor determinado para Φ é porém desconhecido; se fôsse conhecido bastaria se ter um valor p estipulado e somente aprovaríamos um antígeno se Φ fôsse maior que p ; em caso contrário o antígeno seria rejeitado.

Esse critério, no entanto, não pode ser usado porque o verdadeiro valor de Φ desconhecido. MALTANER e THOMPSON, (1948) estipularam porém dois valores $p' = p''$ e aceitam o antígeno quando não há mais que 2% de risco que Φ seja menor que p' e o rejeitam se o risco não é maior que 2% de se ter Φ maior que p'' .

A Tabela III indica os valores de $p'=0,75$ e $p''=0,85$; assim aceitamos um antígeno quando não há mais de 2% de risco de que Φ seja menor que 75% e o rejeitamos se não há mais que 2% de risco de achar se Φ maior que 85%. Se com o número de observações feitas não pudermos decidir, continuaremos a acumular mais observações.

A Tabela III nos dá a primeira oportunidade de alcançar uma decisão; a rejeição do antígeno é final, mas a aprovação depende do número de observações a serem feitas e depende dos valores estipulados para p' e p'' . Para p'

e p'' respectivamente iguais a 0,75 e 0,85, o número de observações deve ser no máximo de 267 (Gráfico 14); quando p' e p'' são iguais a 0,975 e 0,995 respectivamente, o número máximo de observações a serem feitas é de 536 (Gráfico 25, Tabela IV).

Os Gráficos 24 e 25 nos mostram qual é o limite de n ; é então sempre possível estipular o limite de observações a serem feitas pois as duas linhas que limitam as zonas de rejeição, aceitação e indecisão, tendem a se aproximar quando n cresce. O limite dessa aproximação é igual a um, porque é esse o valor mínimo possível entre n'_a e n''_a (ver Tabelas III e IV).

Para que um antígeno possa ser aprovado, em comparação com um antígeno padrão, o número de observações deve ser suficiente para permitir que a frequência Φ seja na realidade um dado significativo no antígeno em prova. Quando os dados caem na zona de indecisão, continuamos a acumular observações até se obter uma decisão, sempre considerando que a rejeição é final, mas a aceitação condicionada por um número mínimo de observações.

TABELA III

DECISÕES NO TESTE SEQUENCIAL DE PROBABILIDADE DIRETA NA PROVA DE REATIVIDADE COMPARATIVA PARA ESPECIFICIDADE, INDICANDO A PRIMEIRA OPORTUNIDADE PARA ACEITAR OU REPROVAR UM ANTÍGENO.

a	n'_a	n''_a	a	n'_a	n''_a	a	n'_a	n''_a
0	14	—	18	111	72	36	195	170
1	21	—	19	115	77	37	200	176
2	28	—	20	120	83	38	204	181
3	34	4	21	125	88	39	209	187
4	39	7	22	130	93	40	213	193
5	45	11	23	134	99	41	218	198
6	50	15	24	139	104	42	222	204
7	56	19	25	144	109	43	227	210
8	61	24	26	149	115	44	231	215
9	66	28	27	153	120	45	236	221
10	71	33	28	158	126	46	240	227
11	76	37	29	163	131	47	245	233
12	81	42	30	167	137	48	249	238
13	86	47	31	172	142	49	254	244
14	91	52	32	177	148	50	258	250
15	96	57	33	181	153	51	263	256
16	101	62	34	186	159	52	267	261
17	106	67	35	190	164	53	—	267

Depois de n observações, anotamos o número de defeituosas a e decidimos: aceitar o antígeno na prova de reatividade comparativa se n_a não é menor que n' e o rejeitamos inteiramente se n não é maior que n''_a .

Se uma decisão não puder ser feita, continuamos a acumular observações. O risco de uma decisão errada é de 2% em um ou outro sentido e a concordância das observações está num intervalo entre 75% e 85%.

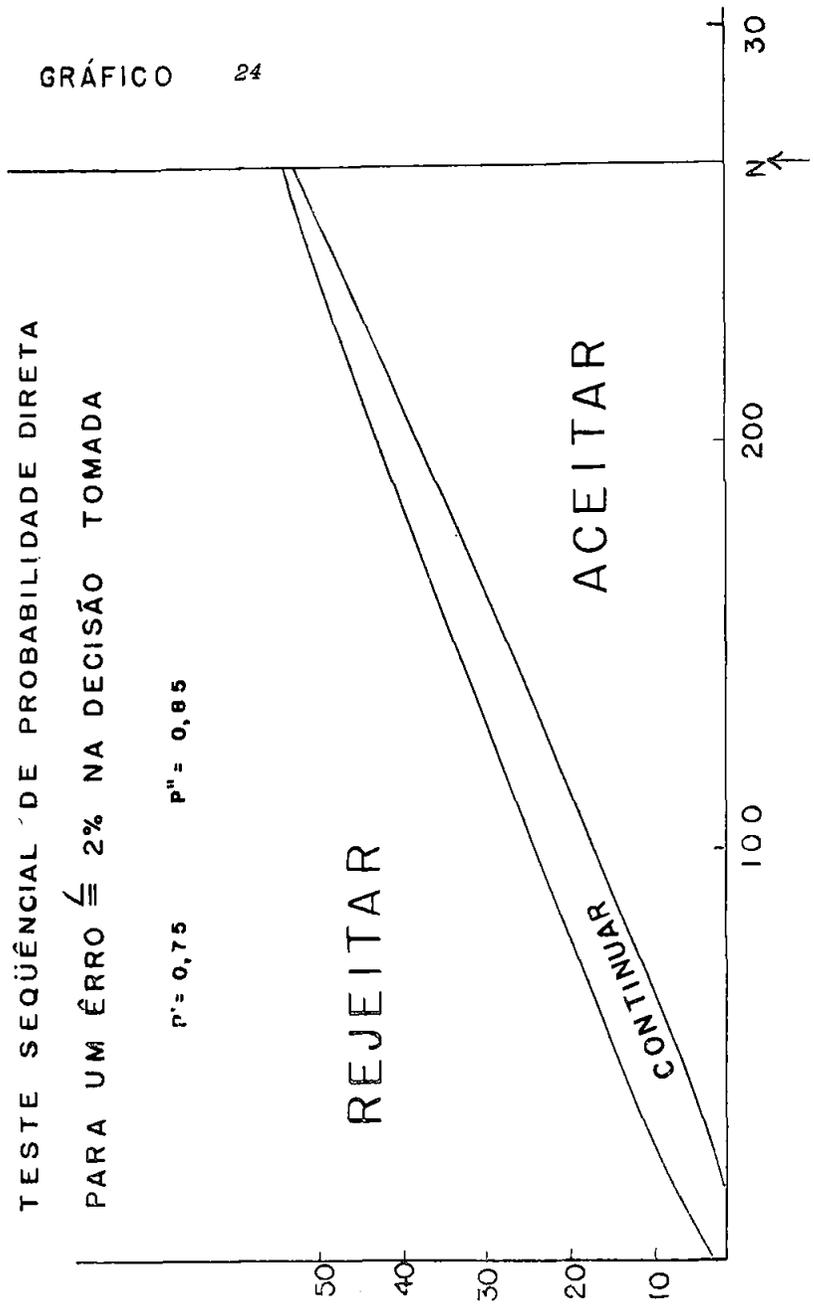
(De "Cardiotipin antigens" W. H. O. 1951).

TESTE SEQÜENCIAL DE PROBABILIDADE DIRETA
PARA UM ÉRRO \cong 2% NA DECISÃO TOMADA

$P' = 0,75$ $P'' = 0,85$

GRÁFICO 24

z = NÚMERO DE OBSERVAÇÕES DEFEITUOSAS



N NUNCA EXCEDERÁ 267

N = NÚMERO TOTAL DE OBSERVAÇÕES

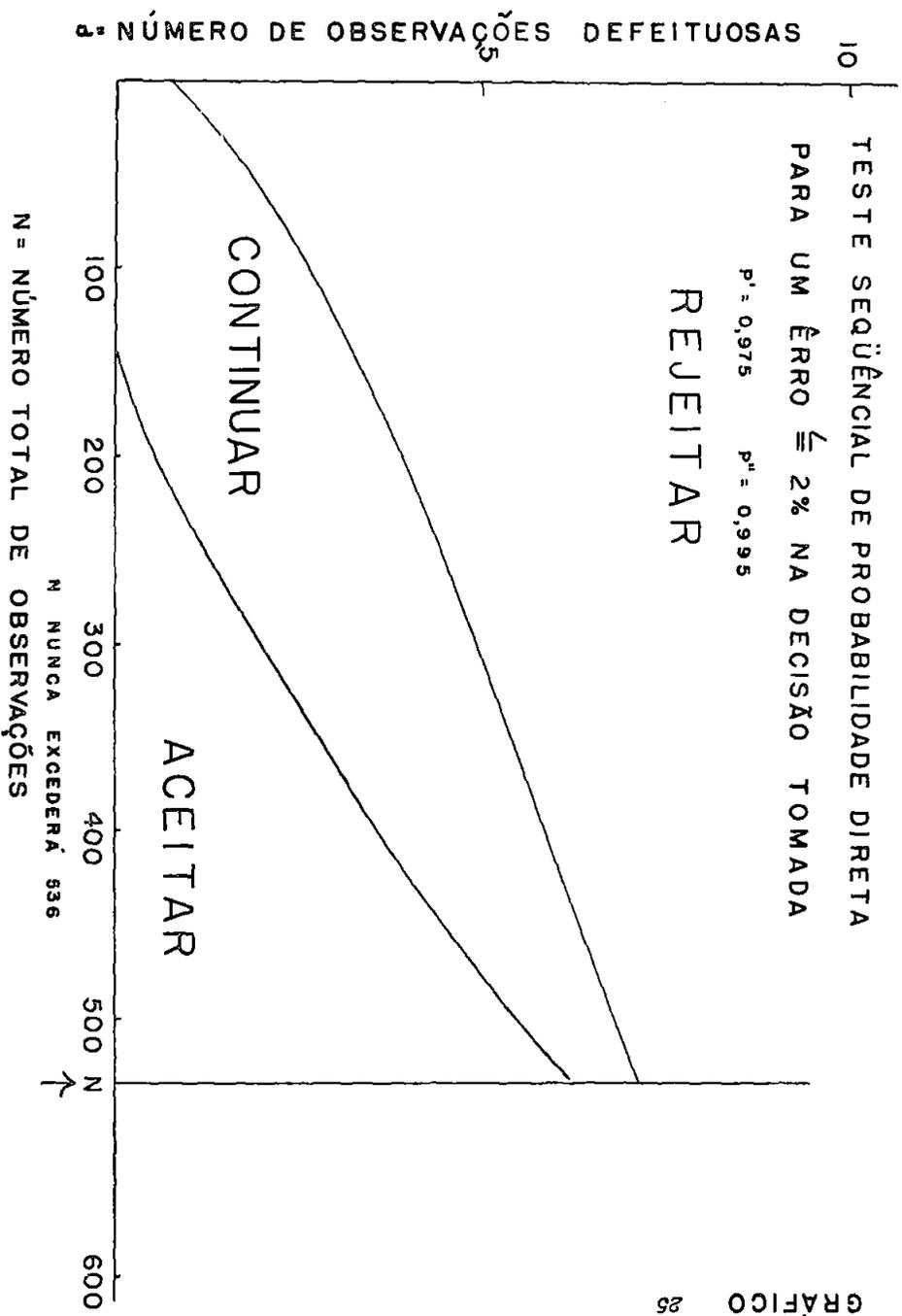


TABELA IV

DECISÕES NO TESTE SEQUENCIAL DE PROBABILIDADE DIRETA PARA REATIVIDADE NAO ESPECÍFICA, INDICANDO A PRIMEIRA OPORTUNIDADE PARA ACEITAR OU REJEITAR UM ANTÍGENO.

NÚMERO DE OBSERVAÇÕES DEFEITUOSAS	ACEITAR SE O NÚMERO DE OBSERVAÇÕES, n , É IGUAL OU MAIOR QUE:	REPROVAR SE O NÚMERO DE OBSERVAÇÕES, n , É IGUAL OU MENOR QUE:
(a)	($n' \quad$) a	($n'' \quad$) a
0	155	—
1	231	4
2	299	43
3	362	114
4	421	204
5	479	307
6	536	419
7	—	538

O risco de uma decisão errada, era um e outro sentido, é de 2% e a percentagem de concordância está entre 97,5% e 99,5%.

(De "Cardiolipin antigens" WHO, 1951).

TESTE PARA REAÇÕES NÃO ESPECÍFICAS

Cada soro é examinado com dois antígenos: um chamado A_T ou antígeno de referência ou padrão e outro A_t ou antígeno em teste. A reação é feita em presença de 3 unidades de complemento e com a dose de antígeno achada de máxima reatividade para o antígeno A_T . Os elementos da reação são pipetados nas quantidades e na mesma ordem como citados na Tabela V.

As reações com menos de 100% de hemólise são lidas com fotômetro, de acordo com a técnica. Os tubos com mais de 90% com antígeno A_T indicam *soros não reagentes*; pares de testes feitos como acima indicado, em paralelo com os antígenos A_T e A_t e que dão mais de 90% de hemólise com A_T são considerados "*observações admissíveis*". Uma observação é considerada *defeituosa* se o grau de hemólise obtida com o antígeno A_t é igual ou menor que 80%; de outro modo é classificada como observação *não defeituosa*.

Consideremos n o número de observações admissíveis, das quais a é o número das observações defeituosas. A primeira decisão possível é feita de acordo com a Tabela IV; após n observações com a defeituosas, aceitamos o antígeno A_t se n não é menor que n'_a e o rejeitamos de vez, se n não é maior que n''_a se não pudermos decidir, continuaremos nossas observações, até que os dados acumulados permitam uma decisão em um ou outro sentido.

TABELA V

TESTE COM 6 UNIDADES DE COMPLEMENTO		
Sôro humano inativado	0,05	0,05
Antígeno A_r (diluído)	0,10	—
Antígeno A_t (diluído)	—	0,10
Complemento (6 unidades)	0,10	0,10
Solução salina	0,05	0,05
90 MINUTOS A 37°C. JUNTAR ENTÃO:		
Hemácias sensibilizadas	0,20	0,20
15 MINUTOS A 37°C. LER HEMÓLISE %		

O propósito dêsse teste é evitar antígenos com excessiva reatividade não específica. Para nos guardar contra a influência de efeitos de correlação, pelo uso dos mesmos reagentes, é recomendado que se façam grupos de reações em dias diferentes. A experiência acumulada nos estudos de cardiolipina mostram que com êsse teste poucos antígenos evidenciam qualquer observação defeituosa nos primeiros 155 pares de observações e quase todos passam pelo teste.

Nossa experiência com sôro de lepra e antígenos preparados de bacilos da tuberculose mostra no entanto que muitos antígenos falham ao serem submetidos a êsse teste. Assim consideramos necessário sua aplicação pois temos tido ocasião de verificar que antígenos feitos pelo mesmo método podem mostrar reatividade diversa, segundo a amostra do bacilo cultivado ou as condições em que a cultura é feita.

Nesse teste, os soros humanos devem ser cuidadosamente selecionados, dada a grande prevalência de tuberculose-infecção na população. Nosso contrôle foi constituído de 651 soros de crianças entre 2 e 5 anos de idade, tuberculino negativas e colhidos para o contrôle da vacinação anti-poliomielite de SALK. Nesse grupo obtivemos 22% de soros reagentes, dos quais 0,6% com títulos entre 6 e 10. O significado dos títulos menores que 6 não pôde ser apurado, mas sugere reatividade não específica entre alguns soros humanos normais e antígeno preparado de bacilo da tuberculose, quando três unidades de complemento são empregadas. Os dados apresentados evidenciam a necessidade de se empregar 6 unidades de complemento no teste de reatividade não específica (Tabela V).

Soros de doentes de lepra, em forma lepromatosa, foram diluídos em sôro humano negativo, de acôrdo com a Tabela VI. Em tubos de 12 x 75 mm, 0,05 ml de cada diluição foram distribuídos e a reação feita com 6 unidades de complemento e 0,1 ml da solução de antígeno (de acôrdo com a dose indicada pela curva de isofixação) ; o volume é completado para 0,3 ml. com salina boratada.

São as reações feitas em paralelo, usando dois antígenos, como anteriormente, A_r e A_t . Depois de 90 minutos de incubação a 37°C, foram juntados 0,2 ml de hemácias sensibilizadas; as reações são lidas com fotômetro, depois da incubação de 15 minutos a 37°C, nos sobrenadantes dos tubos de hemólise parcial depois de acrescentado 1,0 ml de salina gelada e centrifugados.

TABELA VI
DILUIÇÕES DO SORO REAGENTE

FATOR DE DILUIÇÃO	SORO REAGENTE	SORO NEGATIVO
1,0	—	—
1,3	0,20	0,06
1,8	0,15	0,12
2,4	0,10	0,14
3,2	0,10	0,22
4,2	0,05	0,16
5,6	0,05	0,23
7,5	0,04	0,26
10,0	0,04	0,36
13,0	0,04	0,48
18,0	0,04	0,68
24,0	0,04	0,92

Os resultados das reações são dados em termos de G ou grau de reação, de acordo com a Tabela VII, onde são tabuladas as diluições do soro e as hemólises parciais.

TABELA VII
GRAUS DE REATIVIDADE COM SEIS UNIDADES DE COMPLEMENTO

D (FATOR DE DILUIÇÃO DO SORO)								
g%	1,0	1,3	1,8	2,4	3,2	4,2	5,6	7,5
10	0,330	0,444	0,585	0,710	0,835	0,953	1,078	1,215
15	0,271	0,385	0,526	0,651	0,776	0,894	1,029	1,156
20	0,238	0,352	0,493	0,618	0,743	0,861	0,986	1,113
25	0,210	0,324	0,465	0,590	0,715	0,833	0,958	1,085
30	0,188	0,302	0,443	0,568	0,693	0,811	0,936	1,063
35	0,172	0,286	0,427	0,552	0,677	0,795	0,920	1,047
40	0,156	0,270	0,411	0,536	0,661	0,779	0,904	1,031
45	0,148	0,262	0,403	0,528	0,653	0,771	0,896	1,023
50	0,131	0,245	0,386	0,511	0,636	0,754	0,879	1,006
55	0,113	0,227	0,368	0,493	0,618	0,736	0,861	0,988
60	0,104	0,218	0,359	0,484	0,609	0,727	0,852	0,979
65	0,080	0,194	0,335	0,460	0,585	0,703	0,828	0,955
70	0,075	0,179	0,330	0,455	0,580	0,698	0,823	0,950
75	0,065	0,169	0,310	0,435	0,560	0,678	0,803	0,930
80	0,045	0,159	0,300	0,425	0,550	0,668	0,793	0,920
85	0,023	0,137	0,278	0,403	0,528	0,646	0,771	0,898
90	0,000	0,114	0,255	0,380	0,505	0,623	0,748	0,875

OSBERVAÇÃO: O grau de reatividade é calculado como

$$G = \log D (K' - 1) - 0,568$$

s,A

Para diluições maiores ou igual a 10, calcula-se G, juntando-se 1,0 ao valor correspondente na tabela VII. Assim para D = 13 e hemólise = 30%, G = 1,302.

G para dado sôro é o valor máximo achado, desde que não difira de outro valor de G mais que 0,110. Se uma determinada reação não nos dá nenhum valor de G (como no caso de 100% de hemólise em todos os tubos, ou de hemólise igual a zero em todos os tubos, ou zero num tubo e no próximo 100%) é então classificada como inadmissível. O Quadro IX nos dá um exemplo do cálculo de G.

QUADRO IX
EXEMPLO DA AVALIAÇÃO DE G

TUBO N.º	DILUIÇÃO	HEMÓLISE %	G (TABELA VII)
2	1,3	5%	—
3	1,8	30%	0,443
4	2,4	80%	0,425
5	3,2	100%	—

Para o cálculo tomar o valor máximo de G que é de 0,443. O outro valor de G, 0,425, difere de 0,443 de menos de 0,110. Assim aceitamos 0,443 como G, dentro das especificações de tolerância de discrepância.

Assim cada sôro nos fornecerá dois valores de G, um obtido com antígeno A_r e então será G_r e outro com antígeno A_t e então é chamado de G_t . Os dois valores de G formam um par de resultados ou *uma observação admissível*. Uma observação admissível é considerada defeituosa se

$$\pm (G_t - G_r) \geq 0,070$$

caso contrário é

considerada *não defeituosa*.

O uso de G foi proposto por ALMEIDA ET AL (1955) como equivalente ao uso de T, como definido:

$$T = D \cdot \frac{(K' - 1)}{S, A}$$

A relação entre T e G no sistema lepra é

$$\log T = G + 0.568$$

Sendo R a discrepância observada, 0,070 é o log. do quociente entre os dois títulos T_t e T_r ou entre G_t e G_r .

A relação entre G e R pode ser expressa aproximadamente como:

$$R = 2,203 (G_t - G_r)$$

A substituição de T por G, como proposta, tem a vantagem de simplificar a avaliação das discrepâncias entre as reatividades encontradas e dependentes de dois antígenos em prova. (ALMEIDA & THOMPSON, 1954).

O propósito dêsse teste é verificar comparativamente diferentes antígenos, pois é indesejável ter maior ou menor sensibilidade quanto à reatividade específica no antígeno em teste A_t .

A Tabela III nos dá a primeira oportunidade de poder tomar uma decisão quando conhecemos o número de observações defeituosas a no total de n observações admissíveis; aceitamos o antígeno, quanto à reatividade específica quando n não é menor que n'_a ; rejeitamos o antígeno, de uma vez, se n não é maior que n''_a ; caso contrário, continuamos a fazer novas observações, até ser possível tomar uma decisão.

Para evitar correlações pelo uso dos mesmos elementos na reação, fazemos cada dia um pequeno número de testes, geralmente de 6 a 8. Para que o antígeno seja aprovado n terá que ser igual ou maior que 20 e para rejeitá-lo a deverá ser igual ou maior que 8 (quando 20 observações são feitas).

Um exemplo da aplicação do teste de comparação de reatividade específica é dado no Quadro X.

QUADRO X

COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE DE DUAS PARTIDAS DE ANTÍGENO HA-5 EM TESTES COM 6 UNIDADES DE COMPLEMENTO E COM DOSE DE ANTÍGENO IGUAL (1:50 em salina boratada).

SÓRO DE LEPRO N.º	DILUIÇÃO	HEMÓLISE %		REATIVIDADE		CLASSIFICAÇÃO DA OBSERVAÇÃO
		I:	A _r	A _t	G _r	
86	1,3	30	25	0,302	0,324	<i>não defeituosa</i>
	1,8	65	75	0,335	0,310	
95	10	20	30	1,238	1,188	<i>não defeituosa</i>
	13	45	40	1,262	1,270	
307	7,5	15	20	1,156	1,113	<i>não defeituosa</i>
	10	65	70	1,080	1,075	
895	10	25	30	1,210	1,188	<i>não defeituosa</i>
	13	45	40	1,262	1,270	
183	4,2	10	15	0,953	0,894	<i>inadmissível</i>
	5,6	90	85	0,748	0,771	
303	7,5	30	35	1,063	1,047	<i>não defeituosa</i>
	10	90	80	1,000	1,045	
246	3,2	10	25	0,835	0,715	<i>defeituosa</i>
	4,2	55	90	0,736	0,628	

OBSERVAÇÃO: O soro 183 mostra uma reação classificada como *inadmissível*, pois há mais que 0,110 de diferença entre os valores de G, para um mesmo antígeno. Reações atípicas podem ocorrer por aplicação da tabela de fatores de conversão, quando o soro imprime diferente inclinação (h) à curva hemolítica, que a encontrada na maioria dos soros em um determinado sistema (ALMEIDA e FREITAS, 1953).

No Quadro XI apresentamos os resultados do teste de análise seqüencial a algumas partidas de antígeno. A coluna da direita indica os títulos obtidos com o antígeno, utilizando em tôdas as determinações um mesmo soro de lepra (n.º 138). Os testes de análise seqüencial para comparação de reatividade foram feitos com a dose de antígeno encontrada por técnica de isofixação. Dessa forma evita-se a influência da concentração do antígeno na solução testada.

QUADRO XI

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS EM PIRIDINA E LECITINADOS A 0,05%;
O ANTÍGENO PADRÃO É HA-5 (1)

ANTÍGENO	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES		DECISÃO	TÍTULO DO ANTÍGENO
	<i>a</i>	<i>n</i>		$\frac{\Delta K'_{S,a}}{\Delta ant}$
W. K. K. (1)	3	36	aceito	4000
W. K. K. (2)	1	23	aceito	3000
28-OB-S	2	30	aceito	2500
W. K. K. AP	11	14	rejeitado	1000
W. K. K. P	1	22	aceito	2000
HA-5 (2)	4	42	aceito	7500
HA-5 (3)	1	22	aceito	7000
HA-5 (4)	1	23	aceito	6500

OBSERVAÇÃO: Os antígenos W. K. K. foram preparados de acordo com as especificações originais de WITENSKY, KLINGENSTEIN e KUHN (1931) de lotes de bacilos n.º 48189. Os números *entre parêntesis* servem para distinguir a primeira da segunda partida.

W. K. K. AP é o antígeno de W. K. K. preparado de bacilos previamente extraídos com a mistura água, álcool, éter.

W. K. K. P é o antígeno W. K. K. (1) precipitado por acetona em presença de cloreto de sódio.

HA-5, (2) (3) e (4) compreendem a segunda, terceira e quarta partida de antígeno HA-5, preparado de acordo com as especificações dadas no capítulo II.

É necessário notar a grande diferença existente no método por nós proposto para a comparação de antígenos preparados de bacilos da tuberculose, quando usamos "uma dose de antígeno suficiente para se obter uma reação paralela" em vez de uma diluição considerada ótima para o antígeno padrão.

Em teste semelhante aplicado a antígenos de cardioplipina, a dose de antígeno é usada como se fosse igual à encontrada para o antígeno de referência. Nesse caso o teste não só nos dá meios de comparar o comportamento dos antígenos, como também sua própria concentração. Assim se tomarmos um mesmo antígeno de cardioplipina mas em diferentes concentrações, (como por exemplo o antígeno original e outro preparado diluindo-o uma vez em álcool), o teste de análise seqüencial forçosamente o rejeitará. Se no entanto utilizarmos a dose de reatividade paralela, o antígeno será aceito; o método dará a noção da concentração relativa do material antigênico.

O método apresenta grande contraste com aquele utilizado por PADRON (1952) quando comparou os antígenos aquosos precipitados, por método quantitativo, considerando título do antígeno igual à $D(K'_{S,A} - a) + a$. O valor *a* se refere ao primitivo C' descrito por W. M. M.

O Quadro XII mostra os títulos assim determinados em diversas partidas de antígenos aquosos precipitados.

Os antígenos não foram examinados em teste de comparabilidade de reação. Dessa forma apenas tivemos noção da relativa concentração dos extratos aquosos, não de seu comportamento com soros de lepra ou de tuberculose humana.

Geralmente o antígeno era então experimentado com soros de reconhecida positividade, lepra ou tuberculose, em número suficiente para dar informações sobre o comportamento do antígeno de nova partida.

QUADRO XII

TÍTULOS DE ANTÍGENOS DETERMINADOS POR MÉTODO QUANTITATIVO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO (PADRON. 1952).

ANTÍGENO PRECIPITADO BRUTO		ANTÍGENOS TRATADOS PELO BUTANOL	
N.º	TÍTULO	N.º	TÍTULO
48189-A	1230	48189-Mg	3000
48189-E	780	H37-M3	2600
48189-F	1360	H37-1414	3500
48189-G	900	BCG-1	800
H37-D	1000		
H37-E	1190		
BCG-1	500		

REPRODUTIBILIDADE

Quando se aplica o teste de comparação em análise sequencial poderá se obter uma observação defeituosa por erro técnico inerente ao método, pois é de se esperar que em um determinado tubo os erros de pipetagem se acumulam em um mesmo sentido. Nesse caso, poderíamos ser levados a reprovamos um antígeno injustamente?

Uma pesquisa foi recentemente levada a efeito por ALMEIDA e THOMPSON (1955) comparando um determinado antígeno com êle mesmo. A experiência compreendeu 314 pares de observações com 15 inadmissíveis e as restantes 299 com 139 mostrando diferenças em G menores de 0,018; 232 pares com diferenças menores que 0,035 e 286 com diferenças menores que 0,070. As 13 restantes, eram observações defeituosas (com G igual ou maior que 0,070).

A experiência indica que se pode esperar 4,3% de observações defeituosas por erros técnicos; a incidência é muito mais baixa que a estipulada por MALTANER e THOMPSON (1948) para pares de reações feitas ao mesmo tempo.

RESUMO

A reação de fixação do complemento em sôro de lepra com antígenos preparados de bacilos da tuberculose se deve à atividade haptênica dos fosfatídeos ácidos complexos ligados a carboidratos e solúveis em piridina.

O efeito anticomplementar dos antígenos solúveis em piridina é corrigido pela lecitina; efeito semelhante se observa nos antígenos aquosos do bacilo da tuberculose.

As reações entre antígeno, anticorpo e complemento, podem ser melhor estudadas por meio das "curvas de isofixação" obtidas por projeção de antígeno contra sôro, o complemento sendo mantido constante.

A curva de isofixação em seu ramo vertical permite determinar as condições necessárias para a titulação de antígenos e também a influência da quantidade de sôro presente na reação sobre os parâmetros da linha de regressão: antígeno-complemento.

O ramo horizontal da curva de isofixação indica as condições nas quais se deve processar a titulação do sôro. A influência da dose de antígeno empre-

gada sobre os parâmetros da linha de regressão soro-complemento pôde ser apreciada e dada uma correta interpretação.

A dose de antígeno a ser usada numa titulação de soro é aquela que não afeta o relativo paralelismo das curvas de isofixação. Então, complemento fixado será função linear da quantidade de soro presente.

A parte da curva de isofixação que liga os dois ramos assintóticos, traduz a suplência observada entre soro e antígeno e indica as condições em que a fixação do complemento depende tanto da quantidade de soro presente, como da quantidade de antígeno usado. Nesse caso, a titulação de qualquer um desses elementos não poderá ser feita.

Para a titulação de soros, por método simplificado, fatores de conversão são utilizados. Esses fatores foram determinados para o sistema lepra onde os valores de h sofrem marcada influência da quantidade de complemento necessário para 50% de hemólise, pois há estreita dependência entre a percentagem de complemento fixado e a inclinação da linha de regressão logaritmo de complemento contra logitos de hemólise.

A padronização da reação de fixação do complemento exige a reprodutibilidade das partidas de antígenos. Métodos de análise seqüencial foram então adotados para o sistema lepra e tabelas construídas para maior facilidade de uso e precisão de resultados, com o menor número possível de observações.

A reprodutibilidade dos antígenos solúveis em piridina é maior que a observada com os antígenos aquosos; sua estabilidade é também superior e não se observou, em um ano, qualquer alteração de suas propriedades.

SUMMARY

Water-soluble and pyridine-soluble antigens have been studied by the isofixation method.

Several preparations from each strain of tubercle bacillus have been found to have satisfactory properties for use as antigen in complement fixation reactions for leprosy. Antigens have been compared with one another by the method of isofixation curves. When two preparations tested with the same leprosy serum give the same curve, it is assumed that the two have essentially the same specific reactivity. The several antigen preparations tested have given nearly identical curves. From these curves the antigen dose to be used in the test was determined.

Titers were computed as the slope of regression lines between complement and antigen or between complement and serum, for antigen or serum titrations. Quantitative relationships between serum and complement were found in the presence of a parallel dose of antigen, defined as the dose of antigen that do not disturb the relative parallelism of the isofixation curves in the zone where complement fixation is proportional to the amount of antibody present.

Suitable complement-fixation test-systems adapted to sequential analysis of the data are described for leprosy sera and antigen prepared from tubercle bacilli.

Tests for comparability of specific reactivity of antigen preparations were made with a number of lepromatous sera, each used in a pair of tests with a reference-standard antigen in one and the test antigen in the other. In these tests more convenient preliminary procedures were employed; and in evaluation of the test result, it was used the grade of specific reactivity defined as $G = \log T - 0,568$, for leprosy system, in reactions with six units of complement; G is obtained from a table. This permits determination of admissibility and of classification as defective or not by use of a very simple arithmetic procedure.

The method results in great savings of effort and materials in experimental procedures and in processing the data without any consequent delay or loss of confidence in the ultimate decisions for acceptance or rejection of antigen preparations.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. O., 1950, Contribuição para o estudo das reações quantitativas de fixação do complemento. O sistema hemolítico. Tese da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Brasil. Mimeografada, com 259 páginas.
- ALMEIDA, J. O., 1954, Complement fixation tests with tubercle bacillus antigens. Annual Report of Div. Lab. Res. N. Y. St. Dep. Health: 19-20.
- ALMEIDA, J. O., 1956-a, Isofixation curves as a method of standardization of quantitative complement fixation test. J. Immunol., 76:259-263.
- ALMEIDA, J. O., 1956-b, Complement-fixation reactions with antigens isolated from tubercle bacilli. Annual Report of Div. Lab. Res. N. Y. St. Dep. Health: 12-13.
- ALMEIDA, J. O., 1956-c, Use of model systems to indicate presence of a second agent in tuberculosis antigen preparations. Annual Report of Div. Lab. Res. N. Y. St. Dep. Health: 33-34.
- ALMEIDA, J. O., 1957-a, Cálculo da inclinação h_x da relação logística de von Krogh. Rev. Brasil. Biol., 17:525-530.
- ALMEIDA, J. O., 1957-b, Diversidade de comportamento entre os soros de lepra e de tuberculose, em reações com frações isoladas de bacilo da tuberculose. Rev. Brasil. Leprol., 25: 296-297.
- ALMEIDA, J. O., 1958, Cripto-antígenos e cripto-reações com antígenos de bacilo da tuberculose e soros de leprosos, em reações de fixação do complemento. Cienc. e Cult., 10 :71-76.
- ALMEIDA, J. O., SOUZA CARVALHO, R. P. & PADRON, C., 1956, Complement-fixing antibodies in the sera of 534 lepromatous lepers under treatment with sulfones. Rev. Brasil. Leprol., 24:17-26.
- ALMEIDA, J. O. & FREITAS, J. L. P., 1953, Reações atípicas em fixação do complemento nos sistemas sífilis e doença de Chagas, pelo método quantitativo. Interpretação e determinação do título. Rev. Brasil. Biol., 13:1-12.
- ALMEIDA, J. O., FREITAS, J. L. P. & BRANDÃO, H., 1954, Complement fixation test with a triple antigen for syphilis, tuberculosis, leprosy or Chagas' disease in blood banks. Am. J. Trop. Med., 3:490-494.
- ALMEIDA, J. O., MALTANER, F., SILVERSTEIN, A. M. & THOMPSON, W. R., 1955, Cardioliipin antigens. World Health Organization. Monograph series n.º 6:25-45. ALMEIDA, J. O. & SILVERSTEIN, A. M., 1955, Effect of complement fixation on slope of complement titration. Federal Proc., 14:1491.
- ALMEIDA, J. O. & THOMPSON, W. R., 1955, Incidence of defective observations in replicate complement fixation tests. *Não publicado; cópias sob requisição aos A. A.*
- ALMEIDA, J. O. & THOMPSON, W. R., 1954, Streamlined tests of cardioliipin antigen components for specificity and sensitivity in complement fixation reactions. Annual Report of Div. Lab. Res. N. Y. St. Dep. Health; 31-32.
- ALMEIDA MAGALHAES, A. E., 1957, Contribuição para o estudo da reação de fixação de complemento com antígeno de *Cysticercus cellulosae*. Tese da Fac. Med. de Rib. Preto, Univ. S. Paulo. Mimeograf. 47 páginas.
- ANDERSON, R. J., 1927, A study of the phosphatide fraction of tubercle bacilli. J. Biol. Chem., 74:537-551.
- AOKI, Y. & MURÃO, H., 1933, Zur Brauchbarkeit der Witebskyschen Prinzips der Tuberkulose-Komplementbindungsreaktion für die Lepra. Ztschr. Immunitätsforsch., 79: 165-371.
- ASSIMPÇÃO, L. & SILVEIRA, G. F., 1935, Contribuição ao estudo da fixação do complemento na lepra. Rev. Lep. São Paulo, 2:13-36.
- BABES, V. & BUSILLA, V., 1909, L'extrait éthéré de lépromes gardés depuis des années dans l'alcool comme antigène lepreux. Compt. rend. Soc. Biol., Paris, 67:817-819.
- BAYARRI, S. V. & AHCIR, M. R., 1947, Diagnostico sorologico del kalazar, com el antígeno metílico tuberculoso. Rev. Olin. Espafi., 25:103-107.
- BESREDKA, H. & JUPILLE, F., 1914, De la valeur de la reaction de fixation au cours de la tuberculose. Compt. rend. Soc. Biol., Paris, 76:197-199.
- BIER, O. G., 1936, Sorologia da lepra. Rev. Brasil. Leprol., 4:211-222.
- BIER, O. G., 1957, Bacteriologia e Imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene, 8.ª edição. Cia. Melhoramentos. São Paulo, 914 páginas.
- BIER, O. G. & ARNOLD, K., 1935, Estudos sobre a sorologia da lepra: II. Fixação do complemento na lepra com o antígeno tuberculoso de Witebsky, Klingenstein e Kuhn. Folia Olin. et Biol., 7:9-11.
- Über die Serologie der Lepra. II. Komplementbindung bei Lepra mit dem Tuberkulose-Antigen von Witebsky, Klingenstein and Kuhn. Arch. f. Schiffs. u. Tropen. Hyg., 39:236-238.

- BIER, O. G. & PLANET, N., 1936, Aplicação do processo de Witebsky ao preparo de um antígeno para fixação do complemento na lepra com o Streptothrix leproides (Deycke). Voila Clin. et Biol., 8:72-75.
- 1937, Uber die Serologic der Lepra. VI Anwendung der Witebskyschen Methode zur Herstellung eines Antigens fur Komplementbindung bei Lepra mit "Streptothrix lepricides". Arch. f. Schiffs. u. Tropen. Hyg., 41:565-567.
- BIER, O. G. SIQUEIRA, M. & FURLANETTO, R. S., 1955, Quantitative complement fixation in syphilis as a statistically controlled assay. J. Immunol., 74:51-56.
- BRANTS, J., 1932, Komplementbindungsreaktion mit dem Tuberkulose-Antigen von Witebsky, Klingenstein and Kuhn bei Lepra. Dermat. Wchnschr., 47:1688-1691.
- BROOKS, S. C., 1920, Precise titration of complement. J. Med. Res., 41:399-409.
- BUKANTS, S. C., REIN, C. R. & KENT, J. F., 1946, Studies in complement fixation. 2. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. J. Lab. & Clin. Med., 31:394-399.
- CALMETTE, A. & MASSOL, L., 1909, Sur les conditions d'obtention de la reaction de deviation de l'alexine (BORDET-GENGOU) avec les antigenes et les anticorps tuberculeux. Compt. Rend. Soc. Biol. Paris, 67:528-530.
- CHARGAFF, E. & SCHAEFER, W., 1935, Analyse serologique des diferentes fractions lipidiques du BCG. Ann. Inst. Pasteur, 54:708-714.
- COOKE, J. V., 1919, Complement fixation with acid-fast bacteria: II. In leprosy. J. Infect. Dis., 25:474-492.
- DHARMENDRA & BOSE, R., 1941, Complement-fixation In leprosy with antigens prepared from various acid fast bacilli. Indian J. M. Res., 29:7-22.
- DHARMENDRA, 1941, Complement-fixation by leprosy sera after absorption by various acid-fast bacilli. Indian J. Id. Res., 29:523-525.
- DHARMENDRA, BOSE, R. & SEN GUPTA, P. C., 1946, The preparation of an antigen from Kedrowsky's bacillus for the complement-fixation test for kala-azar. Indian J. M. Res., 34:1-2.
- DIENES, L. & SCHIFF, L. D., 1926, The non-specific activation in the complement fixation test of alcohol soluble antigen of the tubercle bacillus. J. Immunol., 12:123-135.
- DOAN, C. A., 1929, Diagnostic significance of precipitin tests with Anderson phosphate fraction from human, bovine, and avian tubercle bacilli. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 26:672-677.
- EITNER, E., 1906, Usher den Nachweis von Antikörpern im Serum eines Leprakranken mittel Komplementablekung. Wien. klin. Wchnschr., 19:1555.
- EITNER, E., 1908, Zur Frage der Anwendung der Komplementbindungsreaktion auf Lepra. Wien. kiba. Wchnschr., 21:729.
- EICHBAUM, F. M., 1942, Fixação do complemento com o antígeno de Witebsky-KUhn-Klingenstein em dermatoses tropicais: lepra, leishmaniose, pêfnigo foliáceo e blestomicose. Rev. Brasil. Blot., 2:285-300.
- EICHBAUM, F. M., 1943, Reactivity of leprosy sera with lecithin. I. Incidence of the lecithin reaction in Wassermann positive and negative sera of lepers and control cases. Rev. Brasil. Biol., 3:225-230.
- II. Properties of the anti-lecithin reagin in leprosy sera. Rev. Brasil. Biol., 3:231-236.
- FAILLACE, M., 1931, Sorologia da lepra. Reação de Gomes-Deycke. Arq. Riogr. Med., 10:4-7.
- FAURE, M., 1940, Les haptene de fixation de l'alexine. Recherches sur l'haptene lipidique et les phosphatides du bacille tuberculeux. Trabalho do Inst. Pasteur, Paris, 230 pgs. impressas por Douriez-Bataille, Lille.
- FREUND, J., 1927, Alcohol soluble specific substances of B. diphtheriae and of Streptothrix. J. Immunol., 13:161-1699.
- FRUGONI, C. & PISANI, S., 1909, Vtelfache Bindungseigenschaften des Komplementes einiger Sera (Leprakranke) und ihre Bedekung. Berl. klin. Wchnschr., 46:1530. GILBERT, R., 1933, Standardization of the complement fixation test for syphilis. Am. J. Syph., 17:238-281.
- GIORDANO, A. S. & CARLSON, B., 1939, Occurrences of a non specific substance in guinea pig serum fixed by antigen in the Wassermann test. Am. J. Clin. Path., 9:130-135.
- GOMES, J. M., 1927, Desvio do complemento na lepra com o Streptothrix leproide de Deycke desengordurado. Rev. Biol. & Hyg., 1:17-38.
- GOMES, J. M., 1931, Denuncia sorológica da lepra latente. Brasil. méd., 45:661.
- GOMES, J. M., 1935, The Gomes complement fixation test in contacts of lepers. Internat. J. Leprosy., 3:283.
- GOMES, J. M. & ANTUNES, P. C. A., 1930, Desolo do complemento na lepra com o Streptothrix leproide de Deycke desengordurado.
- Sensibilização dos pacientes a esta reação pela administração de iodo de potássio. Rev. Biol. & Hyg., 2:195-174.

- GOMES, J. M. & PATTED, J. D., 1928, Desvio do complemento na lepra. *Rev. Floj. & Hyg.*, 1:89-104.
- GREVAL, S. D. S., 1947, Serological technique (cont.). *Indian M. Gaz.*, 82:668-671. GREVAL, S. D. S., CHANDRA, S. N. & DAS, B. C., 1941, A note on complement fixation test In leprosy and kala-azar with Witebsky-Klingenstein e Kuhn (W. K. K. antigen. *Indian M. Gaz.*, 76:474-475.
- GREVAL, S. D. S., LOWE, J. & BOSE, R., 1939, Complement fixation in leprosy with Witebsky, Klingenstein and Kuhn (W. K. K.) antigen, a new technique. *Indian J. M. Res.*, 26:843-E49.
- HARRIS, A., 1941, Concerning the choice of complement-antigen combination for use in the Kolmer complement fixation test. I. Pretesting method for complement selection. *J. Lab. & Min. Med.*, 27:97-102.
- HAZEN, E. L. & GREENSPAN, A., 1926, A study of non specific reactions of cerebrospinal fluids with the Bordet and Ruelens antigen in the complement fixation test for syphilis. *J. Lab. & Min. Med.*, 21:1185-1190.
- ICHIATA, T., 1940, Praktische bewrtung userer serumreaktion der lepra ala fruhdiagnose. *La lepro* 11, suppl. 8586 (abstract).
- ILLAND, C. N., 1951, The serology of polysaccharides from the tubercle bacilli. *J. Path. & Bact.*, 63:735-741.
- IPSEN, J., 1941, Contribution to the theory of biological standardization. These. Copenhagen, Nyt Nordisk Forlag. Arnold Busck. ed.
- KORNEL, G., 1933, Vergleichende Komplementbtndungsversuche mit serum von Leprosen, tuberkulosen and Luetiken. *Ztschr. Immunitätsforsch.*, 78:207-216.
- LEVENE, P. A., LANDSTEINER, K. & VAN DER SCHEER, J., 1927, Immunization experiments with lecithin. *J. Exper. Med.*, 46:197-204.
- LEVINE, L., COWAN, K. M., OSLER, A. G. & MAYER, M. M., 1953, Studies on the role of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in complement fixation and immune hemolysis. II. The essential role of calcium in complement fixation. *J. Immunol.*, 71:367-373.
- LEVINE, L., & MAYER, M. M., 1954, Kinetic studies on immune hemolysis. V. Formation of the complex EAC'x and its reaction with C'y1,2. *J. Immunol.*, 73:426-434.
- LEWIS, O. A. & ARONSON, J. D., 1923, The complement fixation reaction as applied to leprosy. *J. Exper. Med.*, Baltimore, 33:219-232.
- LOWE, J., 1942, A note on complement-fixation test in leprosy and kala-azar with Witebsky-Klingenstein and Kuhn (W. K. K.) antigen. *Internat. J. Leprosy*, 10:156.
- LOWE, J. & GREVAL, S. D. S., 1939, Complement fixation in leprosy and other diseases by the Witebsky, Klingenstein and Kuhn (W. K. K.) antigen. *Indian J. M. Res.*, 26:833-841.
- MACHEBOEUF, M. & BONNEFOI, A., 1935, Etudes sur lee antigenes fixateurs des bacilles Tuberculeux. Essals de fractionnement et de purification de la fraction lipoidique active comme haptene, extraite de bacilles tués par la chaleur. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 17:1201-1209.
- MACHEBOEUF, M. & FAIIRE, M., 1939, Sur l'existence, dens les bachles tuberculeux, d'acides phosphatidiques complexes constitués par de Panicle glycérophosphorique lie par l'esterification, dune part à des acides gran, et d'autre part à des polyalcoois non azotés. *Compt. rend. Acad. Sc.*, 209:700-702.
- MACHEBOEUF, M. & LEVY, G., 1935, Etudes sur les antigénes fixateura des bacilles tuberculeux. Purification de l'haptène lipoidique de bacilles tués par la chaleur, separation d'avec lee phosphatides, elimination des impuretés azotées. Etude de quelques uns des caractères physicochimiques de la fraction active. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 17: 1210-1234.
- MACIXBOEUF, M., LEVY, G. & FAURE, M., 1937, Recherches sur la nature chimique de l'haptene fixateur lipoidique des bacilles tuberculeux. Etude chimique de la fraction active purifiée. *Compt. rend. Acad. Sc.*, 204:1843-1845.
- MACHEBOEUF, M., LEVY, G., FETHKE, N., DIERYCK, J. & BONNEFOI, A., 1934, Etudes chimiques sur le bacille tuberculeux. Premier memoire. Easels preliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoidiques de corps bacillaires tués par la chaleur. *Ann. Inst. Pasteur*, 52:276-307.
- MALTANER, E., 1938, Complement fixation tests for tuberculosis. Apresentado em seminário do N. Y. State Dep. Health, Albany, em 8 de abril de 1938.
- MALTANER, E., 1940, A study of the sera of lepers in quantitative complement fixation tests for syphilis and tuberculosis. *Am. J. Trop. Med.*, 20:843-848.
- MALTANER, E. & GNESH, G. M., 1948, A method for the determination of titers between 10 and 100 in the quantitative complement fixation test for syphilis. *J. Lab. & Min. Med.*, 33:383-391.
- MALTANER, E. & MALTANER, F., 1945, The standardization of the cardioliipin-lecithincholesterol antigen In the complement fixation test for syphilis. *J. Immunol.*, 51:195-214.

- MALTANER, F. & ALMEIDA, J. O., 1949, The parallel effects of magnesium on the complementary and coagulative activities of blood serum. *Blood*, 4:728-733.
- MALTANER, E. & THOMPSON, W. R., 1948-a, Application of direct probability sequential analysis to acceptance or rejection of antigens for complement fixation tests for syphilis (Research Report. 11 May) . Dados não publicados. Cópias sob requisição aos A. A. ou á O. M. S.
- MALTANER, F. & THOMPSON, W. R., 1948-b, Direct probability sequential analysis. Application to testing serologic reagents. Annual Report of the Div. Lab. and Res., N. Y. State Dep. of Health, Albany, N. Y. pags. 32-33.
- MARCONDES, J. R., 1929, A reação de Gomes para o diagnóstico precoce da lepra e seu valor profilático. Tese da Fac. Med. de S. Paulo, 50 págs.
- MAYER, M. M., OSLER, A. G., BIER, O. G. & HEIDELBERGER, M., 1946, The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. *J. Exper. Med.*, 84:536-548.
- MAYER, M. M., OSLER, A. G., BIER, O. G. & HEIDELBERGER, M., 1948, Quantitative studies of complement fixation. I. A method. *J. Immunol.*, 59:195-206.
- MEYER, K., 1937, Anticorps polysaccharidiques et proteidiques des serums antituberculeux. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 59:477-491.
- MUCH, H., 1913, Neve immunobiologische and klinische Tuberkulosestudien mit Berücksichtigung der Lepra. *Arch. Dermat. u. Syph.*, 1115:388.
- MUCH, H., 1915, Serological and experimental studies on leprosy, *Lepra. Bibliot. Intern. Paris*, XV:85-88.
- ORNSTEIN, F., 1926, Ueber das antigene Vermogen der Lipoide. *Wien. klin. Wchnschr.*, 39:785.
- PADRON, C., 1952, A study of certain antigens of tubercle bacilli. Comunicação pessoal.
- PANGBORN, M. C., 1949, Antigens from tubercle bacillus. Annual Report of the Div. Lab. & Res., N. Y. State Dep. Health: 13-15.
- 1952, Water soluble antigens of the tubercle bacillus, *Ibid*: 9, 1953, Water soluble antigens of the tubercle bacillus, *Ibid*: 13-15. 1955, Antigens of the tubercle bacillus, *Ibid*: 18. 1958, Antigens of the tubercle bacillus, *Ibid*: 11-12. 1956, Chemical fractions of the tubercle bacillus in relation to serologic studies. *Tuberculology*, 16: 134-137.
- PANGBORN, M. C. & ALMEIDA, J. O., 1955, Antigenic fractions from tubercle bacillus. Apresentado em seminário da Div. Labs. Res. N. Y. State Dep. Health, em 16 de fevereiro de 1955.
- PANGBORN, M. C., ALMEIDA, T. O., MALTANER, F., SILVERSTEIN, A. M. & THOMPSON, W. R., 1955, Cardiolipin antigens. World Health Organization. Palais des Nations. Geneve. 52 págs.
- PANGBORN, M. C., MALTANER, F., TOMPKINS, V. N., BEECHER, T., THOMPSON, W. R. & FLYN, M. R., 1951, Cardiolipin antigens. Publicação da Organização Mundial de Saúde, 63 páginas. Geneve.
- PEREIRA, P. C. R., 1936, La reaction de fixation du complement avec l'antigène de Witebsky, Klingenstein et Kuhn dans la lepre. *Internat. J. Leprosy*, 4:207-214.
- PEREIRA, P. C. R., 1938, Do valor da reação de Witebsky, Klingenstein e Kuhn na lepra. *Rev. Med. Minas*, 5:23.
- PINNER, M., 1925, Complement fixation in tuberculosis. III. Studies on the nature of the antigen. *Am. Rev. Tuberc.*, 12:142-155.
- PINNER, M., 1928, Immunological studies on various fractions of tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.*, 18:497-501.
- PLAUT, F., & RUDY, H., 1923, Immunisierungsversuche mit Lezithin aus Menschenhirn. *Ztschr. Immunitätsforsch.*, 73:385-391.
- RABELLO FILHO, E. & MACHADO, J. C., 1936, Aspectos da pathogenia da lepra tuberculoido: a sôro-reação de Witebsky nessa variedade da lepra. *Rev. Brasil. Leprol.*, 4:307.
- RABELLO FILHO, E., MACHADO, J. C. & PINTO, J. T., 1938, Serologische Studies bei Nervenlepra mit der Witebsky-Klingenstein-Kuhn reaction. *Dermat. Wechnschr.*, 107: 1214.
- RABELLO FILHO, E. & PINTO, J. T., 1938, Interet de la sere-reaction de Witebsky, Klingenstein et Kuhn pour la connaissance des formes de lépre. *Bull. Soc. path. exot.*, 31:339-341.
- RICE, C. E., 1946, Studies of the complement-fixation reaction in virus systems. I. Activities of vaccinia virus antigens and antisera. *J. Immunol.*, 53:225-236.
- RICE, C. E., 1947, A study of the reliability of complement fixation as a method of measuring the activities of sera of high, medium, and low antibody titer. *J. Immunol.*, 55:1-13.
- ROW, R., 1939, Some experimental observations on human and rat leprosy and their significance in the pathogen's and treatment of the disease. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., London*, 32:497-504.

- SACHS, H., & KLOFSTOCK, A., 1925, Die serologische Differenzierung von Lecithin and Cholesterin. *Biochem. Ztschr.*, 159:491-501.
- SCHAEFER, W., 1940, Sur la separation des anticorps lipidiques polysaccharidiques et proteidiques des serums tuberculeux au moyen de la reaction de l'inhibition specific. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 64:301-315.
- SEIBERT, F., 1941, The chemistry of the proteins of acid-fast bacilli. *Bact. Rev.*, 5:69-95.
- SEN GUPTA, P. C., 1945, Complement fixation test with Witebsky, Klingenstein and Kuhn (W. K. K.) or similar antigens: a modified technique. *Indian M. Ga2.*, 80:396-398.
- SEN GUPTA, P. C., 1948, Research on kala-azar in India, 1938-1948. *Proc. Fourth Int. Congress on Tropical Medicine and Malaria*, 2:1135-1142.
- STATINÉANU, A. & DAMELOPOLU, D., 1908, Citado no trabalho dos mesmos A. A., publicado em 1909.
- STATINÉANU, A. & DAMELOPOLU, D., 1909, Fixation de l'iclexine essayée avec le serum at le liquide cephalochaldien des lepreux, en presence de la lecithine comme antigéne. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 66:332-334.
- SOUZA LIMA, L., 1928, O desvio do complemento com o Streptothrix de Deycke leproide desengordurado na lepra. Tese da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. 44 pgs. Editado por Marques Araújo e Cla.
- STENFFENHAGEN, K., 1910, Uber Komplementbindungsreaktion bei Lepra. *Berl. klin. Wchnschr.*, 47:1362.
- TAYLOR, J. & MALONE, R. a, 1924, Complement fixation in leprosy with "defatted" B. tuberculosis antigen-defatted. *Indian J. M. Res.*, 22:127-137.
- THOMPSON, W. R., 1948, Direct probability sequential analysis. Preliminary report. *Bull. Am. Math. Soc. (Soc. Proc.)*, 54:288-289.
- THOMPSON, W. R., 1948, On the use of parallel or non-parallel systems of transformed curves in bioassay; illustration in the quantitative complement-fixation test. *Biometrics*, 4:197-210.
- THOMPSON, W. R., 1949, Direct probability sequential analysis. A simplified foundation for several systems. Annual Report of the Div. Lab. Res. N. Y. State Dep. Health: 29-28.
- THOMPSON, W. R., 1955, Sequential tests of antigen components. Influence of technical variability and of producer aim. Annual Report of the Div. Lab. Res. N. Y. State Dep. Health: 35-36.
- THOMPSON, W. R. & MALTANER, F., 1940, On the construction of graphs and tables for evaluation of the quantitative complement-fixation reaction ratios. *J. Immunol.*, 38:147-157.
- THOMPSON, W. R., RICE, C. E., MALTANER, E. & MALTANER, F., 1949, Some fundamental notions in estimation of complement fixation. I. General relations and a proposed uniform notation. *J. Immunol.*, 62:353-361.
- THOMPSON, W. R. & SILVERSTEIN, A. M., 1954, A study of the relative discrepancy between pairs of simultaneous replicate complement fixation tests with cardiolipin antigen. Research Report, 21 June. Dados nap publicados. Cópias sob requisição à O. M. S. ou aos A. A.
- ULRICH, C. A. & MAC ARTHUR, F. K., 1942, An improved method for the production of anti-sheep hemolysin. *Am. J. Clin. Path. Tech. Section.*, 12:84-85.
- VON KROGH, M., 1916, Colloidal chemistry and immunology. *J. Infect. Dis.*, 19:452-477.
- WADSWORTH, A. B., 1947, Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health, Williams & Wilkins, ed, págs. 261-454.
- WADSWORTH, A. B., MALTANER, F. & MALTANER, E., 1925, A study of the complement fixation reaction in tuberculosis. *J. Immunol.*, 10241-431.
- WADSWORTH, A. B., MALTANER, E. & MALTANER, F., 1931, The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. *J. Immunol.*, 21:313-340.
- WADSWORTH, A. B. MALTANER, E. & MALTANER, F., 1934, A study of the antigenic properties of lecithin and cephalin. *J. Immunol.*, 26:25-48.
- WADSWORTH, A. B., MALTANER, F. & MALTANER, E., 1938, Quantitative studies of the reaction of complement fixation with tuberculous immune serum and antigen. *J. Immunol.*, 35:93-103.
- WEIL, A. J. & BESSER, F., 1931, Die Antigen Eigenschaften von Cholesterin, Cholesterinderivaten and synthetischem Lecithin. *Klin. Wchnschr.*, 10:1941-1944.
- WILLIS, F. F., 1912, The relationship of acid-fast bacilli. *Centrebl. f. Bakt.*, I, 0., 61:37-58. WITEBSKY, E. KLINGENSTEIN, R. & KUHN, H., 1931, Serodlagnostische Untersuchungen bei Tuberkulose. *Klin. Wchnschr.*, 10:1068-1071.