

TESE DE CATEDRA

CT-1

Doc.

626.942

AL 64c

10

Dr. José Oliveira de Almeida

Contribuição para o estudo da reação de fixação do complemento
em lepra.

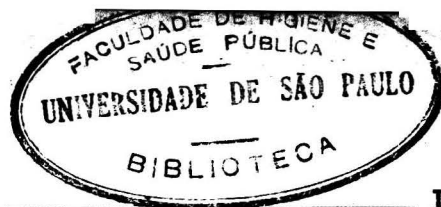
Tese de Concurso para catedrático de
Microbiologia e Imunologia Aplicadas
na Faculdade de Higiene e Saúde
Pública da Universidade de São Paulo.

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia
e Imunologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

1958



ÍNDICE



PREFÁCIO _____	I
INTRODUÇÃO _____	II
Reação de Eitner. Esboço histórico _____	III
Antígenos da reação de Eitner _____	VIII
CAPÍTULO I _____	1
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.	
CAPÍTULO II _____	6
Preparo de antígenos do bacilo da tuberculose. Antígenos aquosos precipitados e antígenos solúveis em piridina. Propriedades gerais.	
CAPÍTULO III _____	9
Os elementos da reação de fixação de complemento. Hemácias de carneiro. Complemento	
CAPÍTULO IV _____	11
Reação de fixação do complemento com sôro diluído. Efeito do diluente sôbre o título do sôro. Ação do cálcio e do magnésio.	
CAPÍTULO V _____	17
Curvas de isofixação como método de estudo das reações quantitativas de fixação do complemento.	
CAPÍTULO VI _____	25
Linearidade entre antígeno e complemento. Influência da quantidade de sôro presente na reação.	
CAPÍTULO VII _____	28
Linearidade entre sôro e complemento. Influência da quantidade de antígeno presente na reação.	
CAPÍTULO VIII _____	34
Influência da concentração de antígeno sôbre os parâmetros da linha de regressão sôro-complemento.	
CAPÍTULO IX _____	42
Antígenos aquosos do bacilo da tuberculose. Efeitos sôbre o complemento. Antígenos aquosos lecitinados.	
CAPÍTULO X _____	48
Efeito da lecitina sôbre os antígenos solúveis em piridina. Influência do modo de se misturar a lecitina e de sua dose. Comparação de antígenos.	
CAPÍTULO XI _____	65
Fatores de conversão para o sistema lepra. Definição de <i>h</i> da relação logística de von KROGH. Dependência da percentagem de complemento fixado.	
CAPÍTULO XII _____	77
Estudo comparativo de antígenos. Método de análise seqüencial para o sistema lepra.	
RESUMO GERAL E CONCLUSÕES _____	92
REFERÊNCIAS _____	93
ERRATA _____	100

AGRADECIMENTO

Deixamos aqui expressos nossos mais sinceros agradecimentos aos Drs. LAURO DE SOUZA LIMA e ANTENOR CONSONI do Departamento de Profilaxia da Lepra, ao Dr. RENATO PIZA SOUZA CARVALHO, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de São Paulo e à Dra. ALBA SANCHES da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, por terem cooperado eficazmente na seleção de pacientes e na colheita do sangue de leprosos.

Parte do equipamento utilizado neste trabalho foi cedido por empréstimo à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela Faculdade de Medicina de São Paulo e pelo Departamento de Profilaxia da Lepra. Deixamos registrado nessas linhas não só nossa gratidão como a afirmação de que tal equipamento era imprescindível na realização de nosso trabalho.

O trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Saúde Pública do Estado de Nova Iorque, sob a direção de GILBERT DALLDORF teve apoio em MARY C. PANGBORN na manufatura de antígenos e contou com a assistência permanente de WILLIAM RAE THOMPSON; o trabalho técnico foi praticado por JACK JACOBS e LORETTA DUNGAN, contando ainda com a ajuda inestimável da biblioteca sob a direção de ANNA SEXTON.

Deixo consignada a minha apreciação ao apoio que recebemos, quando assistente do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de São Paulo, do Prof. Dr. ERNESTO DE SOUZA CAMPOS, então titular da cadeira.

Não quero deixar esta oportunidade sem externar o meu débito ao Prof. Dr. ZEFERINO VAZ, Diretor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, não só pelo apoio dado à presente investigação, como também pelas suas palavras de encorajamento e orientação.

Na feitura do presente volume colaboraram eficientemente a srta. LÉA PERDIZA e snrs. HELGIO WERNECK e SEBASTIÃO PORTO.



P R E F Á C I O

ESTE TRABALHO QUE APRESENTAMOS COMO TESE AO CONCURSO DA CADEIRA DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA APLICADAS, DA FACULDADE DE HIGIENE E SAÚDE PÚBLICA, TEVE INÍCIO EM 1951, QUANDO NOS PROPUZEMOS A APLICAÇÃO DA TÉCNICA QUANTITATIVA DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO, PELO MÉTODO DE WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, EM SOROS DE LÉPROSOS EM TRATAMENTO. ESPERÁVAMOS ENCONTRAR UMA CORRELAÇÃO ENTRE REATIVIDADE SOROLÓGICA E ESTADO CLÍNICO DO PACIENTE, POIS TRABALHOS DE VÁRIOS AUTORES PERMITIAM TAL PLANIFICAÇÃO.

DENTRE AS PRIMEIRAS DIFICULDADES ENCONTRADAS, AVULTAVA A INSTABILIDADE DO ANTÍGENO AQUOSO EXTRAÍDO DO BACILO DA TUBERCULOSE, ALIADA A INCERTEZA DE SE PODER REPRODUZIR ANTÍGENOS A PARTIR DO MESMO LÔTE DE BACILOS DESSECADOS. NO ENTANTO, ESTUDOS DE BIER E SEUS ASSOCIADOS INDICAVAM SER O ANTÍGENO SOLÚVEL EM PIRIDINA, ESTÁVEL, REPRODUTÍVEL E DOTADO DE CAPACIDADE DE REAÇÃO COM SORO DE LÉPROSO.

OS DOIS GRUPOS DE ANTÍGENOS FORAM ESTUDADOS COM A COOPERAÇÃO VALIOSA DE PANGBORN, DO DEPARTAMENTO DE SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO DE NOVA IORQUE E COM A COLABORAÇÃO TÉCNICA DE PADRON,* ASSISTENTE DA CADEIRA DE QUÍMICA BIOLÓGICA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA E TÉCNOLOGISTA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

NA INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES DOS ANTÍGENOS TIVEMOS OCASIÃO DE VERIFICAR A IMPROPRIEDADE DE CERTOS CONCEITOS FUNDAMENTAIS DO MÉTODO DE ALBANY; OBSERVAÇÕES DA MESMA ORDEM JÁ TINHAM SIDO FEITAS POR VÁRIOS INVESTIGADORES. O ESTUDO MAIS DETALHADO DAS CONDIÇÕES EM QUE A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO SE PROCESSA, COM SOROS DE LÉPROSOS, E, POSTERIORMENTE DE OBSERVAÇÕES SEMELHANTES EM OUTROS SISTEMAS PERMITIU-NOS APRESENTAR O *método das curvas de isofixação* PARA A NÍTIDA COMPREENSÃO DA REAÇÃO.

O MÉTODO INDICAVA AS CONSEQUÊNCIAS POSSÍVEIS NO USO DE DIFERENTES DOSES DE ANTÍGENO PARA 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 LÓGÍSTICA, E ESTABELEÇER OS PONTOS DE CONTATO ENTRE AS TÉCNICAS ADOTADAS EM ALBANY E AQUELAS EMPREGADAS PELO GRUPO DE HEIDELBERGER.

NA COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS UTILIZOU-SE O MÉTODO SEQUÊNCIAL DE ANÁLISE DE PARES DE RESULTADOS DE MANEIRA SEMELHANTE AO MÉTODO EMPREGADO NA PADRONIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE CARDIOLÍPINA.

AO APRESENTAR AS CONCLUSÕES DESTA TRABALHO, TEMOS A NÍTIDA IMPRESSÃO QUE ATUALMENTE ESTAMOS MAIS PREPARADOS PARA RETOMAR O PROBLEMA PROPOSTO EM 1951, COM O ESTUDO DA REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO DE LÉPROSOS EM TRATAMENTO.

*) Com ajuda de uma bolsa de estudos da FUNDAÇÃO ROCKEFELLER.

I N T R O D U Ç Ã O

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 êsse 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 sêro do leproso 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 sêro de lepra que outro preparado da mesma partida de bacilos, pela técnica de *MALTANER*.

Desde que antígenos aquosos são difíceis de serem reproduzidos, foi empregada uma única partida de antígeno no estudo dos doentes do *Sanatório Padre Bento*; os resultados obtidos então puderam ser comparados. 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 re-investigado e por sugestão nossa foi organizado um programa de estudos 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 sêro de leproso 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 solúvel em piridina, o princípio ativo do bacilo da tuberculose que reagia com sêro de lepra.

PANGBORN (1954), 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 toda a atividade antigênica do preparado original.

Durante a experimentação com essas frações e sêro 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 sêro, o abandono do título por quociente e apresentamos as chamadas *curvas de iso-fixação do complemento* como método para o estudo das relações entre sêro, antígeno e complemento..

Na presente tese estudamos a reação de fixação de complemento para a lepra com o antígeno aquoso de MALTNER 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 avaliado oportunamente pelos leprologistas.

A REAÇÃO DE EITNER. ESBÔÇO HISTÓRICO

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

Dois anos mais tarde EITNER examinava um sêro de leproso com um antígeno preparado de coração de cobaia; obteve resultados positivos na reação de fixação do complemento, semelhantes aos por êle descritos anteriormente.

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

STATINÉANU e DAMELOPOLU em 1908 descreviam anticorpos específicos no sêro de 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 leproso pudessem reagir em provas de fixação do complemento com suspensões bacilares. Já em 1909 FRUGONI e PIZANI obtinham reações positivas examinando onze soros de leproso 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 se orientou 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 leproso, 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 polifixadora* do sêro leproso. Os anticorpos encontrados na leprose seriam relacionados com todo o grupo de microrganismos álcool-ácido resistentes. Haveria no sêro anticorpos anti-ácido 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 quasi profeticamente que disse ser possível talvez produzir uma imunização para ambas as infecções.

Trabalhos esporádicos sôbre 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; todas essas reações tinham sido praticadas com antígenos alcoólicicos; 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 ácido resistentes saprófitas. Mostrou que anticorpos fixadores de complemento estavam presentes em grande concentração em soros de leprosos na forma nodular. Esses soros teriam tendência para dar reações positivas com o antígeno de WASSERMANN, porém, somente 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 caracter diagnóstico do sêro 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 soros examinados. Os antígenos de LEWIS e ARONSON (1923) eram suspensões aquosas de culturas (bacilos da lepra de CLEGG, de DUVAL, de KEDROWSKY, bacilo do smegma). 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 leproide* de DEYCKE; examinando 83 leprosos em reações de fixação do complemento encontrou positividade de 82%; a forma tuberosa com 89%, a mista com 95% a máculo-anestésica com 70% e a forma frustra com 50%; na forma nervosa a positividade foi de 87%.

No mesmo ano FREUND observava que a lecitina aumentava o poder antigênico do extrato alcoólico de *Leptothrix* até 200 vezes, em provas de fixação do complemento.

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 leprosos; 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 frustra, apenas 4 reações foram positivas; examinando 28 comunicantes, encontrou 9 reações positivas. Incluiu contrôles 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 contrôle dos comunicantes (*GOMES, 1935*). Os leprosos 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 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 leprosos 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 de lepra nervosa; o antígeno de *WITEBSKY* era nitidamente superior ao antígeno proposto por *BESREDKA e JUPILLE* (1914).

Resultados semelhantes foram obtidos por *AOKI e MURAO* (1933) que obtiveram com esse antígeno 9 reações positivas em 16 leprosos 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*, mostrando a 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 sêro 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 êsses 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 tuberculoides apresentavam em 70% dos casos, reações negativas, segundo *RABELLO FILHO e PINTO (1938)*.

Os resultados obtidos na *INDIA* por *GREVAL, LOWE e BOSE, (1939)*, confirmavam integralmente os achados da escola de *BIER*; em 12 casos de lepra lepromatosa, tiveram êsses 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; dos 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 e 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 sorológico entre crianças com longo contacto com leprosos em Shorokuto, na *COREIA*. Dentre 34, 2 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 sêro de leproso e antígenos preparados de bactérias ácido-resistentes isoladas de lepromas, não podia servir de argumento para identificar o papel etiopatogênico das culturas, segundo *DARMENDRA e BOSE (1941)* e *DARMENDRA (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 (*DARMENDRA, 1941*).

O trabalho de *BIER e PLANET (1936)* indicando a reatividade do sêro

de leishmaniose com o antígeno de W.K.K. continuava a ter larga repercussão na *INDIA*. 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 no leishmaniose. 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 sêro de calazar teria maior poder de reação com o antígeno de W.K.K. que o próprio sêro 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. Somente soros de tuberculose eram facilmente absorvidos; os soros de lepra puderam ser divididos em dois grupos; um semelhante ao sêro 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 caracter 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 sêro 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 freqüência (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 leprosos. Em 335 contrôles, incluindo 151 soros sífilíticos e tuberculosos, leishmaniose, gravidez, a reação com a lecitina foi positiva em 4% dos soros testados. Maior incidência (8%) foi achada entre os soros sífilíticos. Os anticorpos ou reagina anti-lecitina teriam sua formação relacionada à ação dos fosfatídeos haptênicos 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 *INDIA* (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 metélicos segundo BAYARRI e AHUIR (1947), que em 20 pacientes com punção esplênica positiva para leishmania, obtiveram 18 reações de fixação de complemento positivas com o antígeno de BOQUET e NEGRE.

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, 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 leishmanias demonstradas e com o teste de aldeído 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 de 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% deles tinham títulos menores que 10; 51% títulos entre 10 e 100 e 30% títulos maiores que 100. O segundo grupo com 270 pacientes em tratamento não mais apresentavam bacilos no muco nasal mas somente nas lesões cutâneas. Os títulos em fixação de complemento eram menores que 10 em 33% deles; entre 10 e 100 em 52% e maiores que 100 em 15%. O terceiro grupo de 243 leprosos 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 controle 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% (MALTNER, 1938).

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

Por sua iniciativa e insistência, o antígeno de W.K.K. foi preparado por PANGBORN (1954) e utilizado na sorologia da tuberculose e lepra em ALBANY, N.Y.; A reação de EITNER poderia ser estudada quantitativamente, podendo então se fazer um estudo comparativo entre os dois grupos de antígenos propostos: os solúveis em água e aqueles solúveis em piridina.

ANTÍGENOS NA REAÇÃO DE EITNER

A reação de fixação do complemento em lepra, na maior parte das vezes, 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 INDIA 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 chalmugrico não incentivava a pesquisa sorológica.

No BRASIL, no entanto, o estudo das reações de fixação do complemen-

to foi feito de modo sistemático, GOMES (1927) estudou a aplicação de sua reação em lepra; em 1929 concluía 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, quasi sem sintomas, o seu valor mais se afirma, pois os casos de lepra sêro-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 sêro de lepra com antígenos lipídicos. Apontou a existência de reações de fixação de complemento com lipídes ubiqüitários (tipo WASSERMANN) como com lipídes bacterianos ou de lepromas.

BIER e ARNOLD, 1935, definem a reação de fixação de complemento em lepra, não como consequência do poder polifixante do sêro leproso, ou da marcada labilidade de suas proteínas, mas como verdadeira reação específica. Em 1935, 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, maxime se houver suspeita clínica.

É portanto 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 lipídes fixadores de complemento em presença de sêro sífilítico (BIER, 1936).

Uma exata reprodução do antígeno de WITEBSKY não pode 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 soros 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 isolar a fração específica do bacilo da tuberculose. PINNER (1925) 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 fosfolípidos (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 polisacárides.

Polisacárides 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 polisacarídea.

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 MARCHEBOEUF e seus associados (1935, 1939) a atividade fixadora do complemento estava ligada a um fosfolípide.

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 MARCHEBOEUF (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 MARCHEBOEUF não possuía nenhuma atividade sorológica, *in vitro* ou *in vivo*.

O antígeno de WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KOHN, solúvel em benzol e piridina conteria lipóides e talvez fosfolípides associados a polisacárides.

Em 1940 FAURE publicou seus estudos sôbre os haptenos lipídicos 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 lipídicos. Suas conclusões podem assim ser resumidas:

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

2°) - *A afinidade do hapteno lipídico 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 hapteno lipídico é insolúvel na acetona fervente.*

4°) - *A ação combinada da água, éter, acetona e cloreto de sódio permite lavar a solução aquosa de fosfatídeos, com bom rendimento.*

5°) - *Os preparados mais ativos se apresentam em solução clorofórmica, como uma solução perfeita. Por evaporação do solvente, o resíduo toma uma aparência vítrea, transparente, quasi 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 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°) - *A composição química do hapteno é semelhante à dos ácidos graxos, associados a glúcides; são azotados na proporção de 3%; os preparados mais ativos sorologicamente parecem consistir de sais de sódio, cálcio e magnésio de ácidos fosfatídicos, como complexos de ácidos glicero-fosfatídicos.*

8°) - *A atividade haptênica dos preparados mais ativos é perdida*

quando se faz o fracionamento dos fosfátides ácidos. A atividade antigênica estaria ligada a uma pequena parte dêles.

9*) - O hapteno é de natureza lipídica, pois sua atividade acompanha sempre os fosfátides e nos diversos fracionamentos ela sempre é achada entre os lípides.

10*) - Após múltiplos fracionamentos vê-se o hapteno se concentrar em uma solução que não contém proteínas, nem glúcides livres, mas que possui ácidos glicero-fosfatídicos complexos associados à ósides e à inositol.

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 paralisou suas pesquisas sobre os antígenos do bacilo da tuberculina.

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

No mesmo ano que FAURE publicava seu trabalho, em ALBANY, MALTANER 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 cardiolipina, 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 existente na reprodução de antígenos satisfatórios; tentando reproduzir o preparado de ANDERSON (1927) verificou que o nitrogênio e fósforo variaram de partida para partida; se o elemento responsável pela reação de fixação de complemento fôsse um fosfatídeo complexo, era de se esperar que seu sal de bário pudesse fornecer um antígeno mais puro. Realmente os antígenos assim preparados reagiam 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 SOUZA LIMA (1952) 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 São 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 tratados 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 lípides e poli-

sacárides; eram lipopolisacárides, contendo 2% de fósforo e açúcares não redutores; a reação do carbasol mostrava a presença de manose.

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

O antígeno solúvel em piridina foi fracionado. O estudo dessas frações com sêro de lepra permitiu o conhecimento das relações quantitativas entre os elementos da reação de fixação de complemento pela técnica de *WADSWORTH*, *MALTANER* e *MALTANER*. Muitas dessas informações são aqui apresentadas e compreendem em sua maioria experiências realizadas com os antígenos solúveis em piridina, que tinham se mostrado nas mãos de *BIER* e seus associados, de grande especificidade e sensibilidade na sorologia da lepra.

C A P Í T U L O I

GENERALIDADES SOBRE AS REAÇÕES QUANTITATIVAS DE FIXAÇÃO DE 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 hemólise; 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 sêro de cobaia necessária à hemólise de 50%. Comparando o número de unidades de complemento necessárias para 50% de hemólise quando sêro e antígeno estão presentes, verificaram WADSWORTH, MALTANER e MALTANER que havia uma proporção direta entre complemento e sêro.

Um considerável excesso de sêro 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 inter-relação, as quantidades de antígeno, sêro e complemento, devem ser proporcionais, de forma a permitir não só uma fixação máxima, como também deixar livre aproximadamente uma unidade de complemento.

As relações lineares entre sêro 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 sêro, 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 sêro 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. Sêro 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 usada 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 negligível 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 sêro; a reatividade do sêro é calculada na base da diluição capaz de dar 50% de hemólise, quando 6 unidades de com-

plemento estão presentes. Esse método adotado nos serviços de rotina de sífilis em *ALBANY* foi proposto por *MALTANER e GNESH* (1948).

Essa técnica 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 as linhas de regressão soro-complemento tenham inclinações diferentes. 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 empregados de soro.

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 de 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* propuzeram-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 50%; 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:

1º) - 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 esteja presente.

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

3º) - 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 *WADSWORTH, MALTANER e MALTANER*; as mudanças na atividade do complemento são indicadas em unidades 50%; nos gráficos 1 e 2 êsses valores estão no eixo das ordenadas; em abcissas, as quantidades de antígeno ou de soro empregado (em ml).

Para contrôlle da reação, dosagens de complemento são feitas em pre-

sença de antígeno ou de sêro, para o conhecimento da atividade anticomplementar desses elementos. Dosagens de complemento foram praticadas com misturas de sêro e antígeno, determinando-se diretamente a quantidade necessária para 50% de hemólise, para diferentes diluições de sêro.

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

Uma reação com tal técnica seria impraticável em serviços de saúde pública. Se fôsse conhecido o valor médio da constante h da equação que relaciona hemólise com complemento, bastaria 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 sêro, 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 graus de hemólise; 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 sobre lisinas bacterianas, empregando pesos para melhor seguir a linha de regressão, de acordo 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 somente as supostas fontes de erro: a variação biológica na resistência individual ao agente em questão e o erro da amostra usando esse número de indivíduos; esse 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 bio-ensaios. Seu trabalho sobre 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:

$$\log x = \log K + h \log (y/1-y)$$

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

As 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. Nêsse 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:

1º 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:

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

Esse é o método utilizado por *WADSWORTH, MALTANER e MALTANER* 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.

2º 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: $\log V'$ e logitos de hemólise. V' significa volume da mistura; a inclinação da reta é dada pela expressão:

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

Esse 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 sífilítico.

Em determinadas condições h'_x pode ser igual à $h'_{V'}$, como mostraremos ao tratarmos dos fatores 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 deste trabalho.

Introduzimos, por necessidade de exposição das condições em que a reação é praticada, alguns símbolos, definidos como:

$K'_{S,a} = K'$ quando sôro está em excesso na mistura da reação.

$K'_{s,A} = K'$ quando o antígeno está em excesso, em relação à quantidade usada de sôro.

O parâmetro h' toma iguais designações:

$$h'_{S,a} \text{ e } h'_{s,A}$$

$K'_{S,A} = K'$ 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 *STANDARD METHODS* (1947).

GRÁFICO I

Relação sôro-complemento

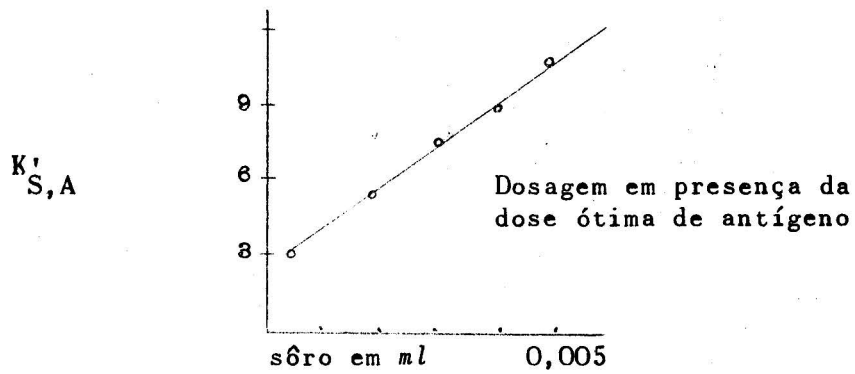
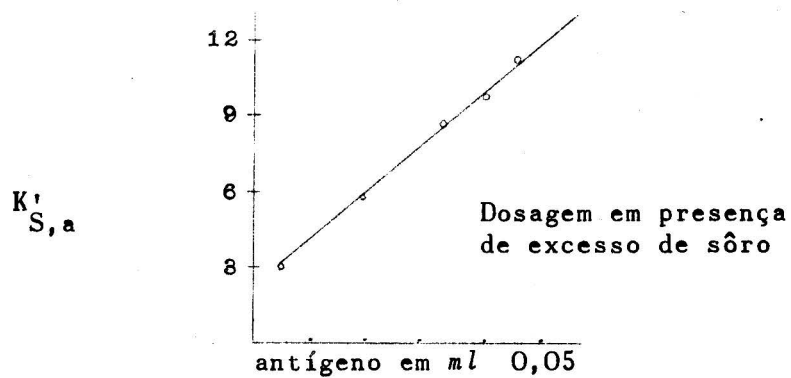


GRÁFICO II

Relação antígeno-complemento



CAPÍTULO II

PREPARO DE ANTÍGENOS DO BACILO DA TUBERCULOSE. ANTÍGENOS AQUOSOS PRECIPITADOS E ANTÍGENOS SOLÚVEIS EM PIRIDINA. PROPRIEDADES GERAIS.

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 acôrdo com *PADRON*, (1952) preparado a quente, com a seguinte técnica:

1° Duas 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° Centrifugar a quente a 3.000 rpm. durante 30 minutos, em copos de 250 ml.

3° Colhêr o sobrenadante e ressuspender as células em outros 100 ml de água destilada; repetir o processo de extração, combinando os dois sobrenadantes.

4° Esfriar o extrato, deixando em geladeira por toda a noite. Ajustar o pH a $4,0 \pm 0,1$, com ácido acético 5M; 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 a 3°C. Desprezar o sobrenadante.

5° 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° 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 3.000 rpm. (suporte *INTERNATIONAL* n° 392). Colhêr 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 5.000 rpm. em *SERVALL* durante 1 hora. Colhêr o sobrenadante.

8° 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 concentrado é então misturado ao sobrenadante aquoso, descrito em 7°.

9° As frações aquosas combinadas são dialisadas contra água destilada por toda a noite, em constante agitação.

10° O antígeno aquoso dialisado é então liofilisado 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 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° Juntar mertiolato para uma concentração final de 1:10.000. A solução é o antígeno aquoso precipitado que reage com sêro de lepra e de tuberculose (humana), mas não com sêro imune de cavalo.

13° A parte solúvel em álcool-éter, quando tratada pela água e dialisada, para remoção dos solventes orgânicos dá uma solução também opalescente que reage com sêro de cavalo imunizado à tuberculose, mas não fixa complemento com sêro 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 (1954) 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. Esse antígeno, chamado em nosso trabalho de *H-A5* é feito de acôrdo com a seguinte técnica:

1°) - 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°) - Centrifugar. Colhêr o sobrenadante. Os bacilos são re-extraídos, depois abandonados. Os sobrenadantes 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 isotônizar.

3°) - Deixar em geladeira por uma noite. O precipitado é colhido por centrifugação e lavado várias vêzes em acetona, antes de secar.

4°) - Dissolver o precipitado sêco em água destilada, a quente. Centrifugar em *SERVALL*, a 5.000 rpm. por uma hora. Desprezar o sedimento.

5°) - O sobrenadante é re-precipitado com acetona e cloreto de sódio, como prêviamente. 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°) - A parte solúvel em piridina representa 60% em pêsso do precipitado e tem toda a atividade antigênica do extrato original.

7°) - 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. Isotonizar com cloreto de sódio. Esse é o antígeno designado por *PANGBORN* como *HA-5*.

PROPRIEDADES GERAIS DOS ANTÍGENOS

O antígeno aquoso precipitado é bastante impuro, contendo proteínas desnaturadas, ácidos nuclêicos e grande quantidade de carboidratos associados a fosfolípidos. Sua solubilidade em água, a presença constante de polisacárides, sugerem que a atividade antigênica esteja relacionada com êsses compostos, uma vez que a parte lipídica não reagiu com o sêro humano de tuberculose. Um dos fosfátides que reage com o sêro de cavalo, quando associados à lecitina e colesterol, fixa complemento com sêro sifilítico, de maneira idêntica à cardiolipina, da qual não pode ser diferenciado sorològicamente (*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. Esse 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 (polisacárides). 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 termos de $10^{-5} \text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{seg}^{-1}$ em 0,1 N de solução fosfatada tampão de pH = 7,7.

O antígeno solúvel em piridina pode ser fracionado pelo metanol. A parte solúvel contém praticamente toda 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 cor marron (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 lipopolisacáride e provavelmente é o mesmo isolado por *FAURE* em 1940, por métodos diferentes.

Outra fração isolada do extrato solúvel em piridina contém 65% 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 lípides.

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

CAPÍTULO III

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 glucozada 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 apresente-se 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 iso-aglutininas.

Preparar a suspensão a 5% juntando ao sedimento de hemácias a quantidade necessária de solução salina. Aferir a suspensão em fotômetro, onda de 545 $m\mu$ (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 sôro de carneiro, segundo o método de UL-RICH-MACARTHUR (1942).

Ao sôro do coelho imunizado juntar parte igual de glicerina quimicamente pura. Neste trabalho, hemolisina significa sôro-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% (aproximadamente 0,3 ml da solução a 1:200 de sôro de cobraia).

As hemólises parciais obtidas com hemácias diversamente sensibilizadas permitem definir nessa dosagem duas zonas bastante nítidas. Na primeira as 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 tubo, que é o limite entre a primeira e segunda zona, indica a concentração de hemolisina que produziu 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 sôro humano. Nesse caso hemácias ótimamente sensibilizadas funcionam apenas como indicador de complemento li-

vre 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 cobaios (em média 30 cobaios), 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 otimamente 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 X 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 abcissa 50% de hemólise um ponto que projetado sobre o eixo das ordenadas, determina o logaritmo da quantidade de complemento necessária para 50% de hemólise.

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 $0,20 \pm 0,02$.

Se o complemento testado 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 o teste de prova com cada uma delas, para evidenciar qualquer possível erro nas diluições. Manter as soluções em gelo fundente até usa-las.

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

CAPÍTULO IV

REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM SÔRO DILUÍDO. EFEITO DO DILUENTE SOBRE 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 reação, 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 reação de WASSERMANN quantitativa de WADSWORTH, MALTANER e MALTANER; 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 reação 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 diferenciavam umas das outras por uma quantidade constante.

DILUENTE

É quasi 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 interesse saber qual a influência exercida pelo diluente nas reações de fixação de complemento em lepra.

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

O quadro I mostra os resultados obtidos com solução salina boratada e sôro normal usados como diluentes do sôro de lepra, segundo métodos descritos nos capítulos VII e VIII.

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

Em série paralela de testes em duplicata THOMPSON e SILVERSTEIN (1953) encontraram apenas 1% de observações *defeituosas* em 300 pares de reações, utilizando o mesmo diluente e o mesmo antígeno.

Os nossos dados sugerem ser o diluente responsável pelo maior número de reações 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 previamente testados 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.

QUADRO I

TÍTULOS DE SÓROS DE LEFRA LEPROMATOSA DETERMINADOS POR REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO QUANTITATIVA E DILUIDOS EM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA BORATADA OU SORO HUMANO NORMAL.

Soro nº	Sol. boratada	Soro normal	Discrepância achada
575	24	25	4,1%
986	28	28	0 %
586	12	14	15,8%
1019	26	22	16,7%
105	48	48	0 %
1066	80	86	7,2%
1200	37	35	5,5%
4965	484	448	2,7%
649	38	47	21,2%
499	11	12	9,5%
1008	160	148	7,8%
1051	19	15	28,6%
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%.

Soro 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 0,85% 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 1 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-diethylbarbitúrico e 3,75 g de 5-5-diethylbarbiturato de sódio em 2 litros de água destilada. Ao usar, diluir uma parte dessa solução em 5 partes de água destilada. Juntar então cloreto de cálcio e cloreto de magnésio para as concentrações respectivas de 0,00015 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 apresentava mais ativo com magnésio que com solução fisiológica.

Em uma série de trabalhos *LEVINE ET AL* (1953, 1954) estudaram o papel desempenhado pelo cálcio ionizado na fixação do complemento e concluíram ser esse 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 ionios nas reações de fixação do complemento.

Estudando o efeito da diluição do sôro 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 sôro capaz de dar, em presença do antígeno, 50% de hemólise com 6 ou 12 unidades de complemento. Os testes foram feitos ao mesmo tempo.

Os protocolos I e II mostram que se considerarmos as duas reações com o mesmo valor absoluto da unidade de complemento (em termos de sôro de cobaia) os títulos são os mesmos, quer em salina boratada, quer em salina-veronal com metais, pois 1,7 unidades-veronal equivaleram a uma unidade salina-boratada.

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

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

Na técnica quantitativa de *W.M.M.* a quantidade de sôro é relativamente grande em comparação com os outros elementos, pois empregamos 0,05 ml de sôro para um volume total de reação igual a 0,3 ml. Se a diluição do sôro é feita com sôro humano normal, não haverá razões para suplementar Ca^{++} e Mg^{++} o teor dêsses ionios presentes na reação; outras vezes êsses metais são supridos pelo próprio sôro de cobaia, usado em concentração grande (diluições 1:10 a 1:5), na técnica de *WADSWORTH, MALTANER e MALTANER*. Consideramos portanto desnecessário na técnica que adotamos o uso da solução tamponada de veronal, com Ca^{++} e Mg^{++} pois usamos diluir o sôro leproso em sôro 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.

É de se esperar que sendo o título dado em número de unidades de complemento o valor achado com veronal seja 1,7 vezes maior que o determinado com salina. Realmente foi essa a reação encontrada: $35,6/21 = 1,7$.

PROTOCOLO I.

REAÇÕES COM OS ELEMENTOS DILUIDOS EM SOLUÇÃO SALINA BORATADA

SÔRO DE LEPRA Nº 22455	ANTÍGENO H-A5 LECITINADO A 0,05% (ml)							
	0,020	0,015	0,010	0,005	0,020	0,015	0,010	0,005
	UNIDADES DE COMPLEMENTO							
ml	6				12			
	HEMÓLISE %							
0,030	0	0	0	0	50	25	35	35
0,020	0	0	0	0	100	100	100	100
0,015	45	10	10	0				
0,010	100	95	85	80				
0,008	100	100	100	100				

CONTROLES

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

DO SÔRO, COM UNI- DADES DE COMPLEMENTO			DO COMPLEMENTO COM:		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	
40	90	100	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 DILUIDOS EM SALINA-VERONAL COM Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺

SÔRO DE LEPRO Nº 22455	ANTÍGENO HA-5 LECITINADO A 0,05% (ml)							
	0,020	0,015	0,010	0,005	0,020	0,015	0,010	0,005
	UNIDADES DE COMPLEMENTO							
	6				12			
	HEMÓLISE %							
0,015	0	0	0	0	70	85	10	0
0,010	0	0	0	0	100	90	90	75
0,008	0	0	0	0	100	100	100	100
0,006	20	80	10	0				
0,004	100	100	80	85				
0,002	100	100	100	100				

CONTRÔLES

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

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

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

OBSERVAÇÃO:

Todos os elementos da reação foram diluídos com solução salina tamponada de 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 DO TÍTULO

$$T = \frac{\Delta K'_{S,A} \cdot 0,05}{\Delta S\acute{O}R\acute{O}}$$

De acôrdo 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

S Ô R O	HEMÓLISE %		$K'_{S,A}$	$\Delta S\acute{O}R\acute{O}$	$\Delta K'_{S,A}$	TÍTULO
	6 u	12 u				
0,080		50	12			
0,015	45		6,2	0,015	5,8	19,8
0,080		25	15,5			
0,015	10		8,9	0,015	6,6	22,0
0,080		85	18,6			
0,010	85		4,9	0,020	8,7	21,8
0,080		85	18,6			
0,010	80		5,1	0,020	8,5	21,8
TÍTULO MÉDIO						21,1

REAÇÕES COM VERONAL-Ca++Mg++

0,010		75	10,8			
0,004	85		6,5	0,006	8,8	31,7
0,010		90	9,0			
0,004	80		5,1	0,006	8,9	32,5
0,015		85	18,6			
0,006	80		6,7	0,009	6,9	38,8
0,010		70	10,6			
0,005	20		7,4	0,004	8,2	40,0
TÍTULO MÉDIO						35,6

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

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

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

$$35,6 / 21,1 \approx 1,7$$

CAPÍTULO V

CURVAS DE ISOFIXAÇÃO COMO MÉTODO 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 todas as técnicas de fixação do complemento consiste em fazer reagir diferentes concentrações de antígeno com diversas diluições de sêro, a quantidade de complemento sendo mantida constante. (Técnica de titulação em bloco, *BIER*, 1955).

Em nosso trabalho também utilizamos esse método, porém com diferente interpretação, projetando antígeno em abcissas contra sêro 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, escolheremos as quantidades de sêro e de antígeno capazes de reagir com o complemento, fixando 5 unidades. O ponto 50% de hemólise, por ser 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*, 1955).

Podemos levantar outras curvas de isofixação para o sistema em estudo; o gráfico *III* apresenta duas curvas de isofixação determinadas com seis e nove unidades de complemento, traduzindo as relações quantitativas entre sêro e antígeno (protocolo *III* e *IV*).

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 decresce, Q tende 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 afetam a reação. Assim os pontos de isofixação descrevem uma curva com uma parte assintótica ao eixo das abcissas.

Outras curvas de isofixação podem ser traçadas empregando diferentes

quantidades de complemento. O gráfico IV nos mostra as curvas obtidas com três, seis, nove e doze unidades de complemento, com sêro de lepra e antígeno lecitinado HA-5

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

$$Q = f(Z)$$

São essas as condições necessárias e suficientes para a determinação do título de um sêro, de acôrdo com os conceitos definidos no capítulo VII.

Outra condição encontrada na curva de isofixação é mostrada pelo ramo vertical da curva. Nessa parte, o sêro (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 sêro pouco afetam a reatividade da mistura em que se forma o complexo imune com antígeno (W) e anticorpo presente, expresso em termos de sêro Z.

Neste caso obtemos condições para que o 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 V nos mostra duas curvas de isofixação. As quantidades de antígeno, presentes na reação com excesso de sêro, quando projetadas contra as unidades de complemento fixado, descrevem pontos sôbre uma reta. O título do antígeno pode ser calculado segundo os conceitos definidos no capítulo VI.

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 mostra 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 em que êsses elementos (antígeno ou sêro) es-

tão presentes na mistura-reação.

Devemos, no entanto, considerar as curvas de isofixação obtidas com antígenos que apresentam a capacidade de inibir a reação, quando em excesso. É o caso típico da cardiolipina que apresenta curvas em que a assíntota horizontal passa por uma inflexão. A quantidade de antígeno que reage com o mínimo de sêro é indicada por um ponto bastante nítido correspondente à *dose de reatividade máxima*, segundo WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, (1938).

Curvas de isofixação no sistema tuberculose serviram para a determinação da proporção em que sêro e antígeno aquoso se combinam para formar complexos com definida capacidade fixadora de complemento (WADSWORTH, MALTANER e MALTANER, 1938). O método consistia em determinar as relações lineares entre sêro 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 sêro 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 antígeno ou anticorpo, por técnica de fixação de complemento.

GRÁFICO III.

Curvas de isofixação com antígeno lecitinado
e sêro de lepra n.º LP (Protocolo III.)

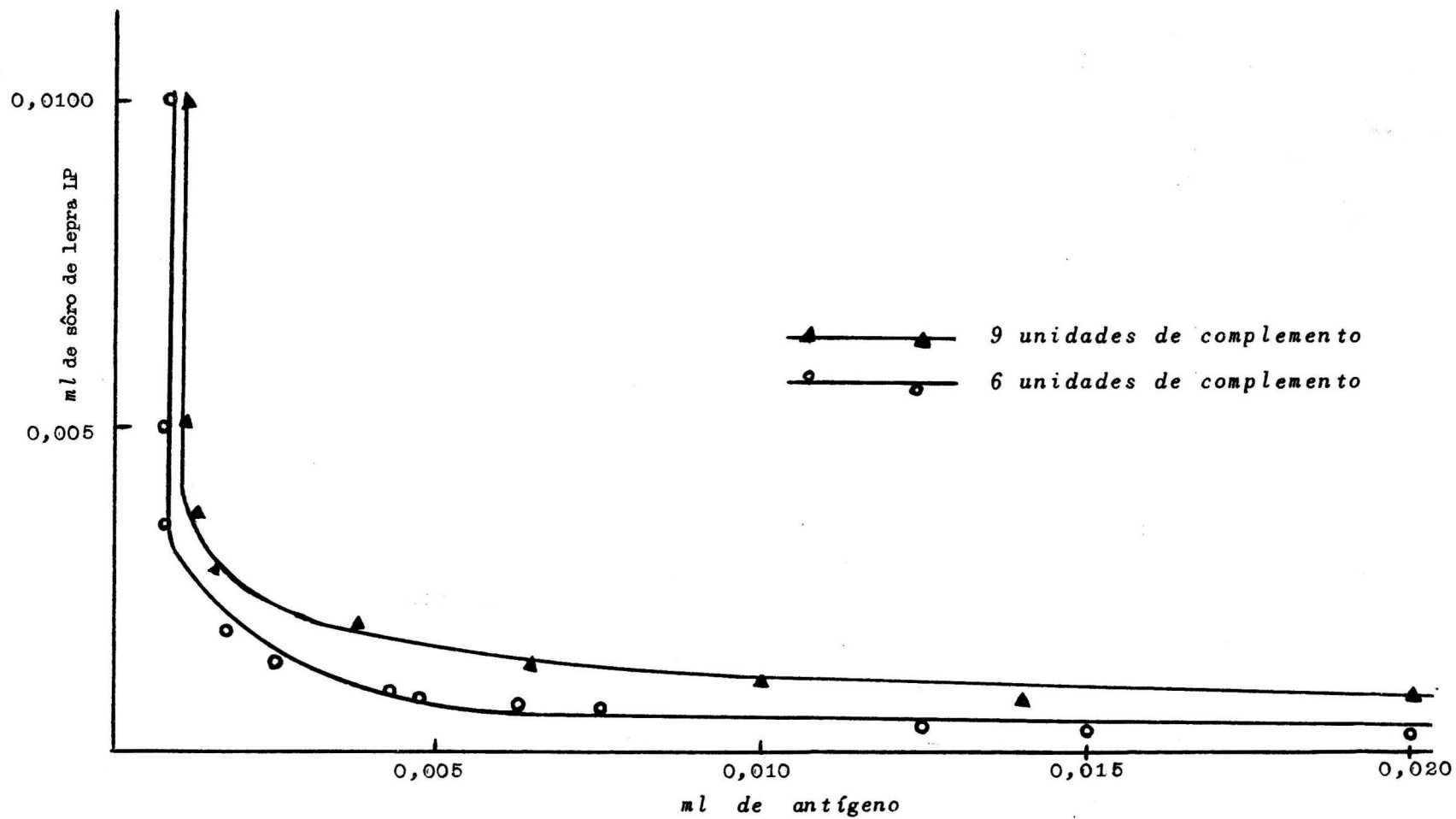


GRÁFICO IV

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

SISTEMA LEpra

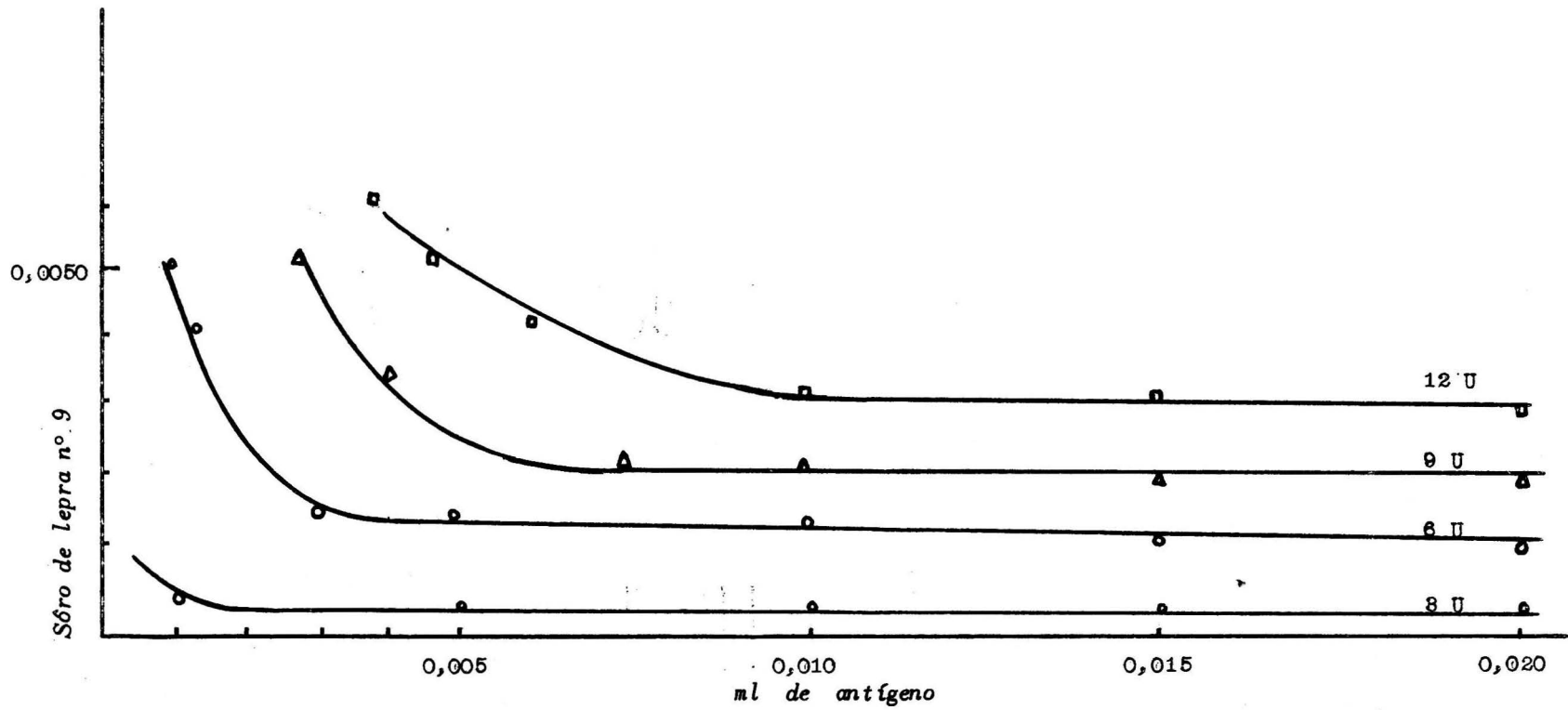
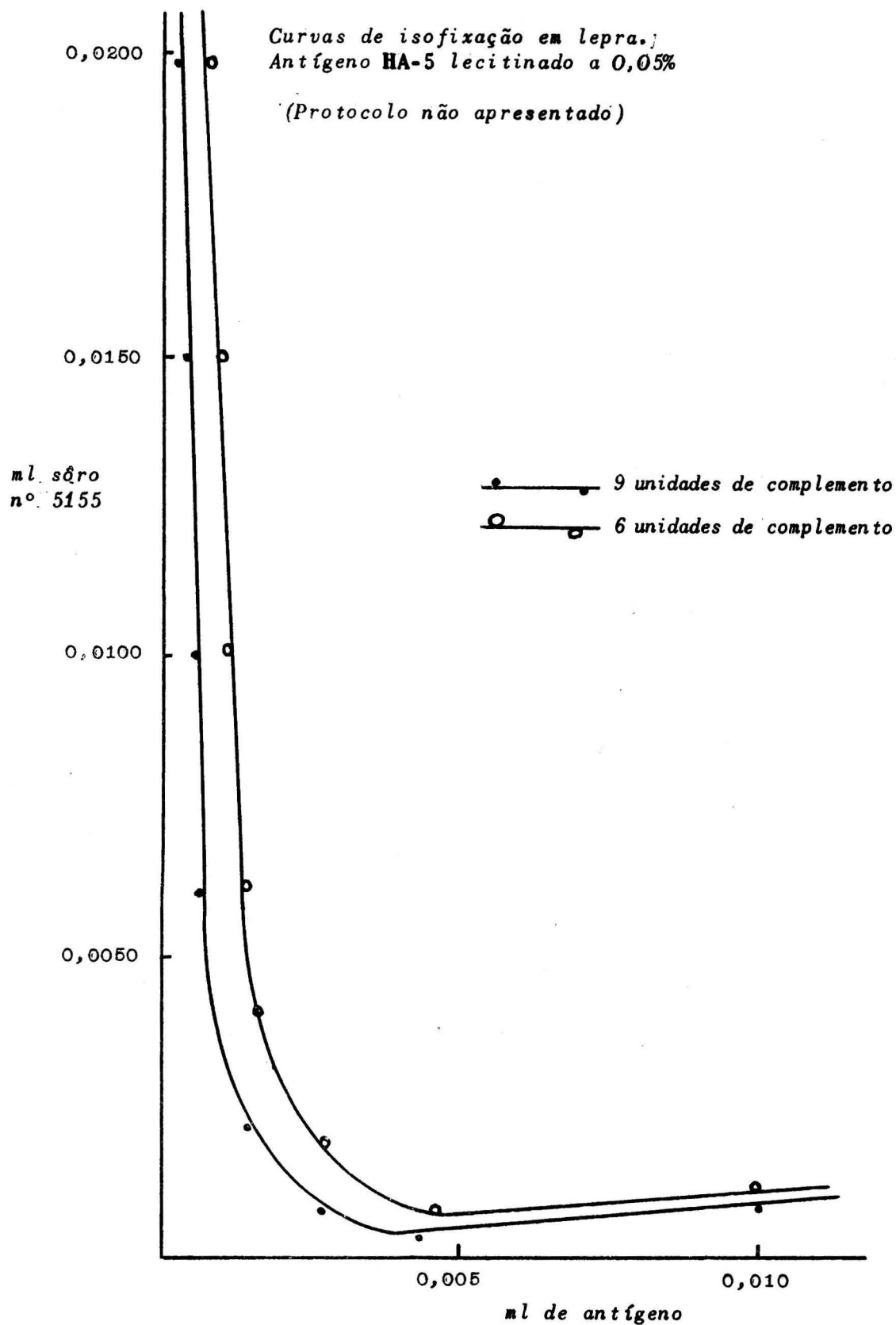


GRÁFICO V

Curvas de isofixação em lepra;
Antígeno HA-5 lecitinado a 0,05%

(Protocolo não apresentado)



PROTOCOLO III

**CURVAS DE ISOFIXAÇÃO EM LEPRA
(gráfico III)**

SÔRO IP DILUIÇÕES DE ANTÍGENO HA-5 LECITINADO A 0,005% 1:										
ml	50	38	25	17	13	8,7	5,0	4,0	3,3	2,5
HEMOLISE % COM 9 UNIDADES DE COMPLEMENTO										
0,0100	87	80	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	80	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

HEMOLISE % 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	80	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	90

CONTRÔLES

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

DO COMPLEMENTO COM:		DO SÔRO COM:		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1U	2U	1U	2U	
15%	90%	45%	100%	0%

Incubação preliminar: 37°C por 90 minutos

Incubação de hemólise: 37°C por 15 minutos

PROTOCOLO IV

CURVAS DE ISOFIXAÇÃO COM EXCESSO DE ANTÍGENO
(grafico IV)

SÔRO DE LEPRA N° 9 ml	ml DE ANTÍGENO					
	0,020	0,015	0,010	0,005	0,008	0,001
HEMÓLISE COM 8 UNIDADES DE COMPLEMENTO						
0,0015	0	0	0	0	0	10
0,0010	0	0	0	0	0	25
0,0005	85	85	80	85	85	55
0,0008	50	50	55	55	50	70

8 UNIDADES DE COMPLEMENTO						
0,0050	0	0	0	0	0	55
0,0040	0	0	0	0	5	80
0,0080	0	0	0	0	25	90
0,0025	5	5	5	10	28	100
0,0020	5	5	5	25	85	100
0,0015	85	85	85	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	80	90	100
0,0080	0	5	15	80	100	100
0,0025	5	10	80	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
0,0085	50	55	55	75	100	100
0,0080	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 SEN- SIBILIZADAS		
1U	2U	1U	2U			
15%	90%	55%	100%	0%		

CAPÍTULO VI

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

Os gráficos *III* e *V* 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 êsses 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 *III* e *V* 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 ($K'S_{50}$) 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 ou doze unidades estão inicialmente presentes na reação.

O título do antígeno é dado pela inclinação da linha de regressão encontrada entre complemento e antígeno.

É no entanto necessário fazer um reparo ao 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 êsse 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 *VI*, 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 quando projetadas contra as quantidades de complemento usadas determinam pontos sôbre uma reta. Podemos ter

assim diferentes linhas de regressão antígeno-complemento (gráfico VI), cada uma delas com valores diversos não só de sua inclinação como de sua intersecção com o eixo das ordenadas. No gráfico VI, 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), pelo método de WADSWORTH, MALTANER e MALTANER.

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

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

Esse 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

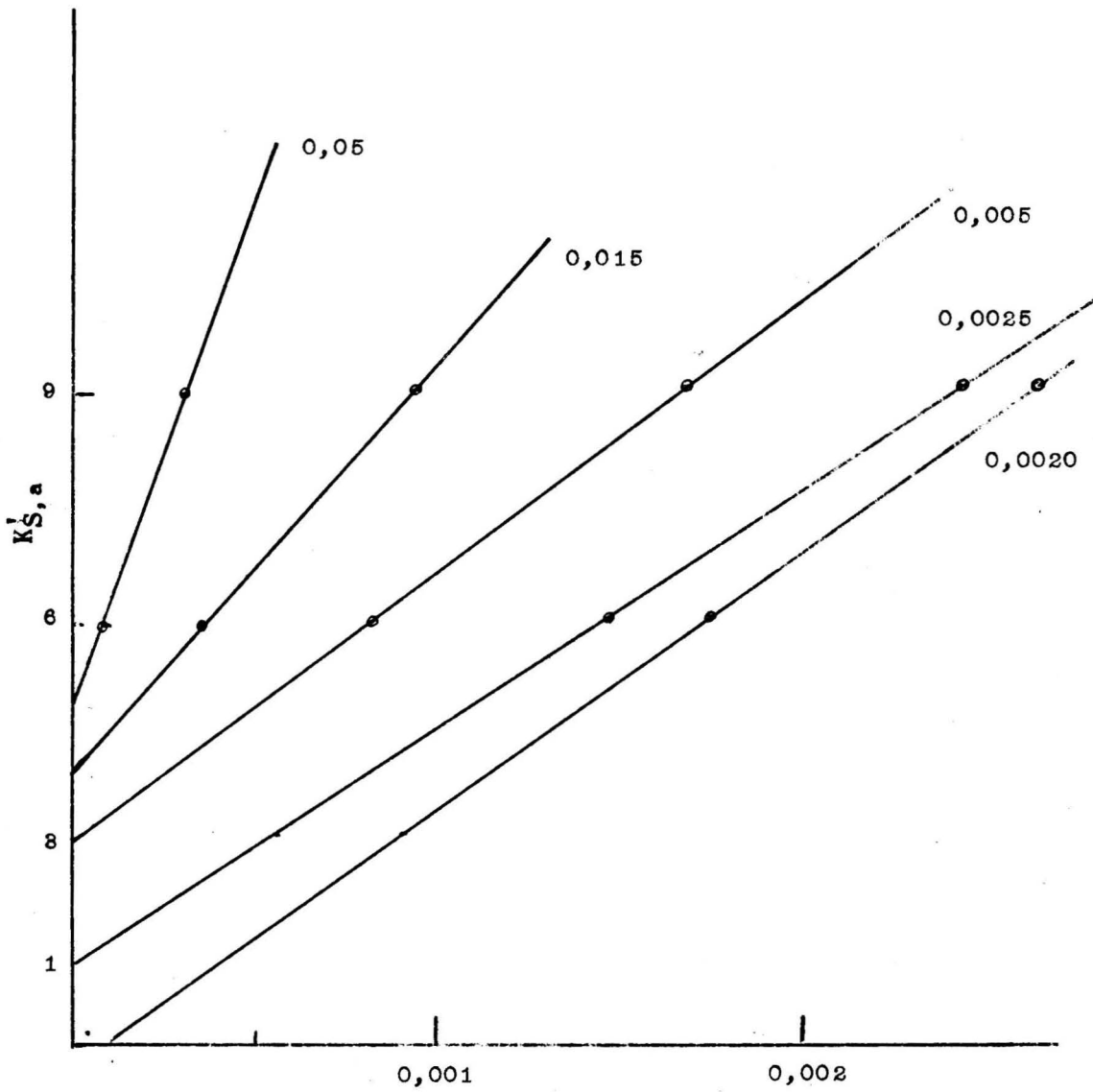
$$K'_{S,a} = a + b.W$$

para S 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.

GRÁFICO VI.

Relação complemento-antígeno em presença de diversas quantidades de sêro de lepra n.º 5155 (da parte vertical do gráfico V).



ml de antígeno HA-5 lecitinado a 0,05%

CAPÍTULO VII

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

Podemos verificar, analisando o gráfico IV, 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 sôro necessárias 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, nas reações com 0,010 ml ou mais de antígeno.

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 a essa condição de dependência, uma vez que na realidade, a formação do complexo fixador de complemento depende sempre do antígeno. As linhas de isofixação do gráfico IV são aparentemente assíntotas, mas se estendermos em maior amplitude a concentração do antígeno, podemos facilmente verificar que elas se aproximam da abscissa à medida que a concentração de antígeno aumenta. Outras vezes, 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 IV).

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

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 cardiolipina e sôro sífilítico (ver gráfico X).

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 controles 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 concen-

GRÁFICO VII.

Relação sêro-complemento em presença de excesso de antígeno.
(Protocolo IV e Gráfico IV).

Antígeno HA-5 diluído a 1:6,67 (= 0,015 ml).

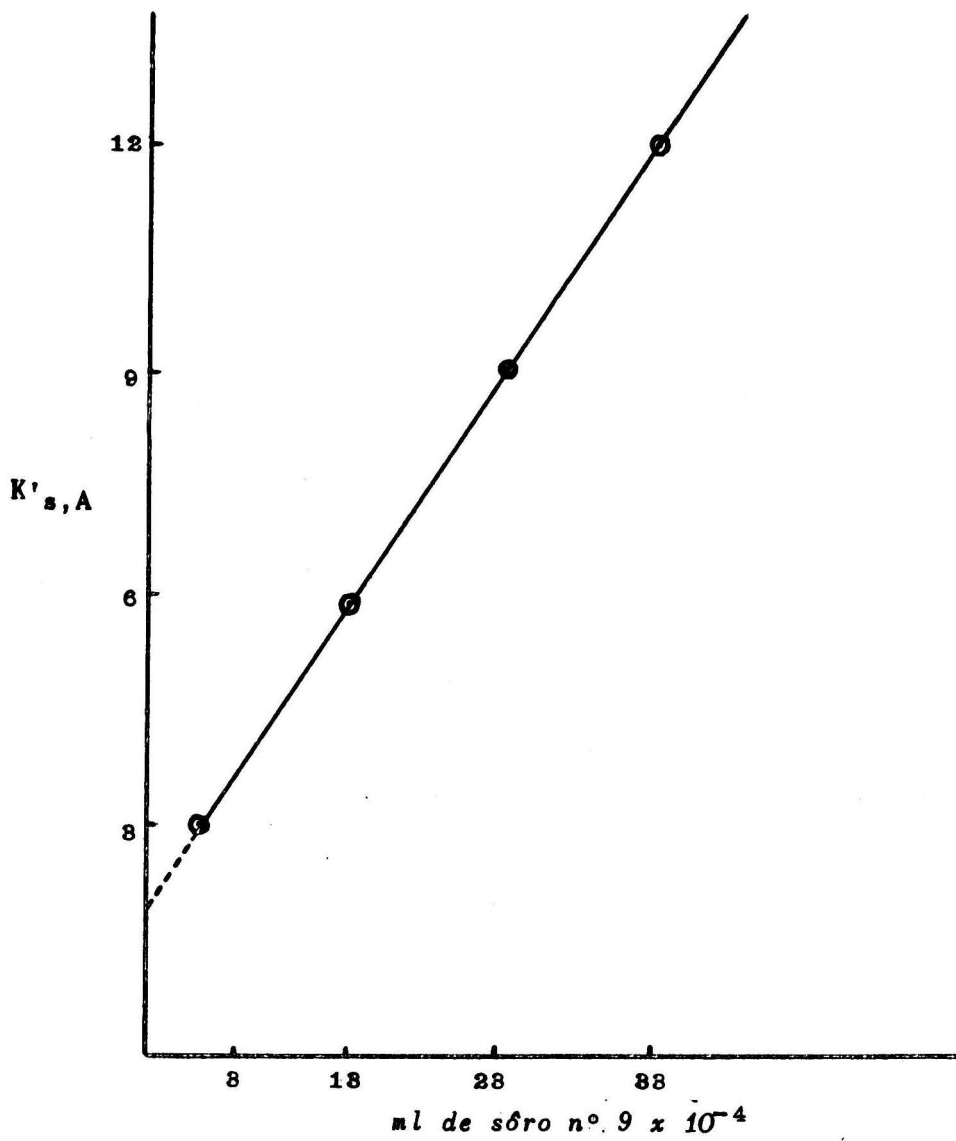
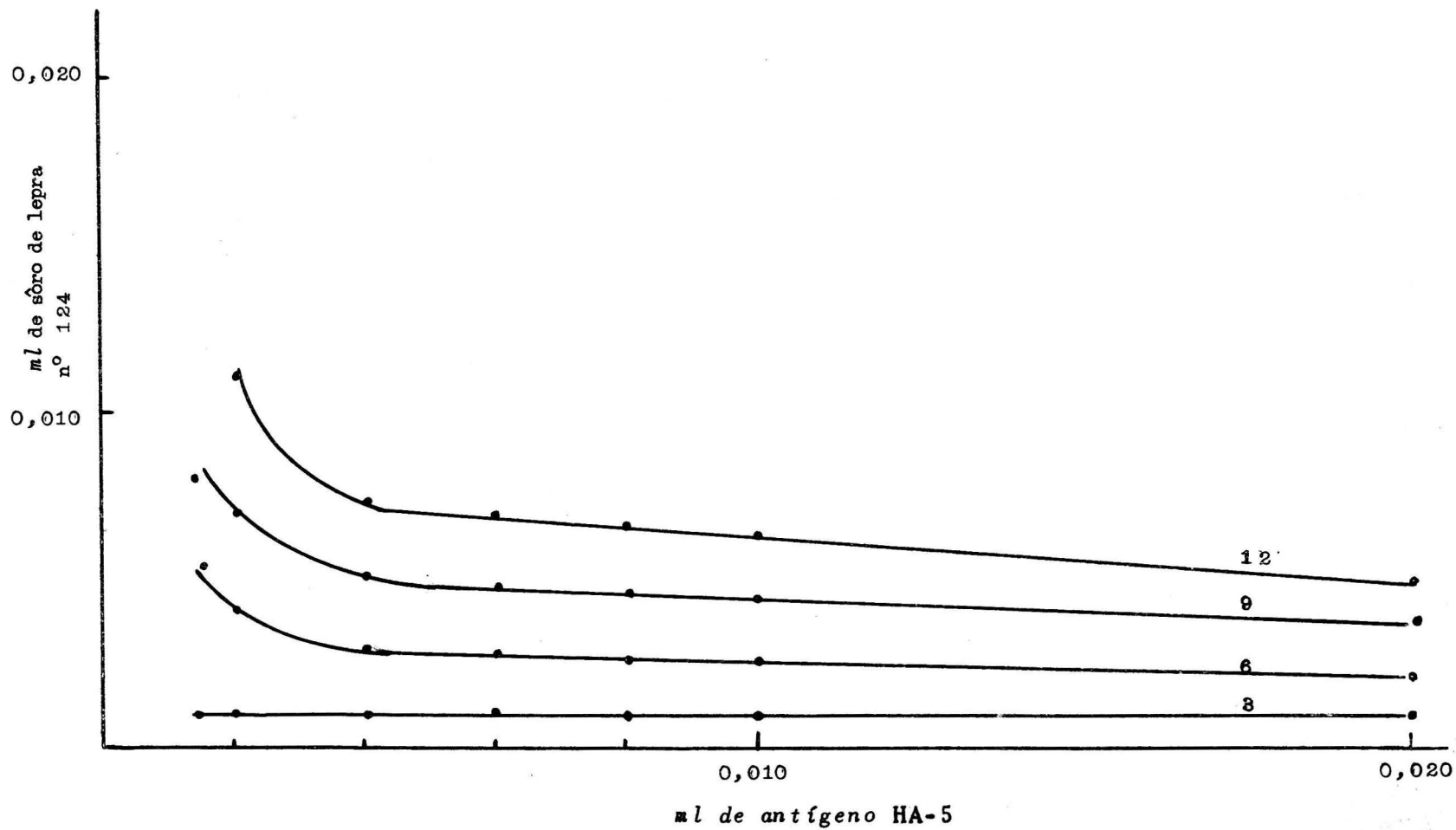


GRÁFICO VIII

Curvas de isofixação com antígeno HA-5 e sêro de lepra n.º 124, com quatro quantidades de complemento. (Protocolo V, página 31)



PROTOCOLO V

CURVAS DE ISOFIXAÇÃO COM EXCESSO DE ANTÍGENO

SÔRO DE LEPRA Nº 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
0,0040	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	85	80	100
0,0060	0	0	0	15	20	90	100	100
0,0050	0	85	85	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	80	100	100
0,0080	0	0	15	25	80	100	100	100
0,0060	0	65	75	80	85	100	100	100
0,0050	80	90	100	100	100	100	100	100
0,0040	70	100	100	100	100	100	100	100

CONTRÔLES

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

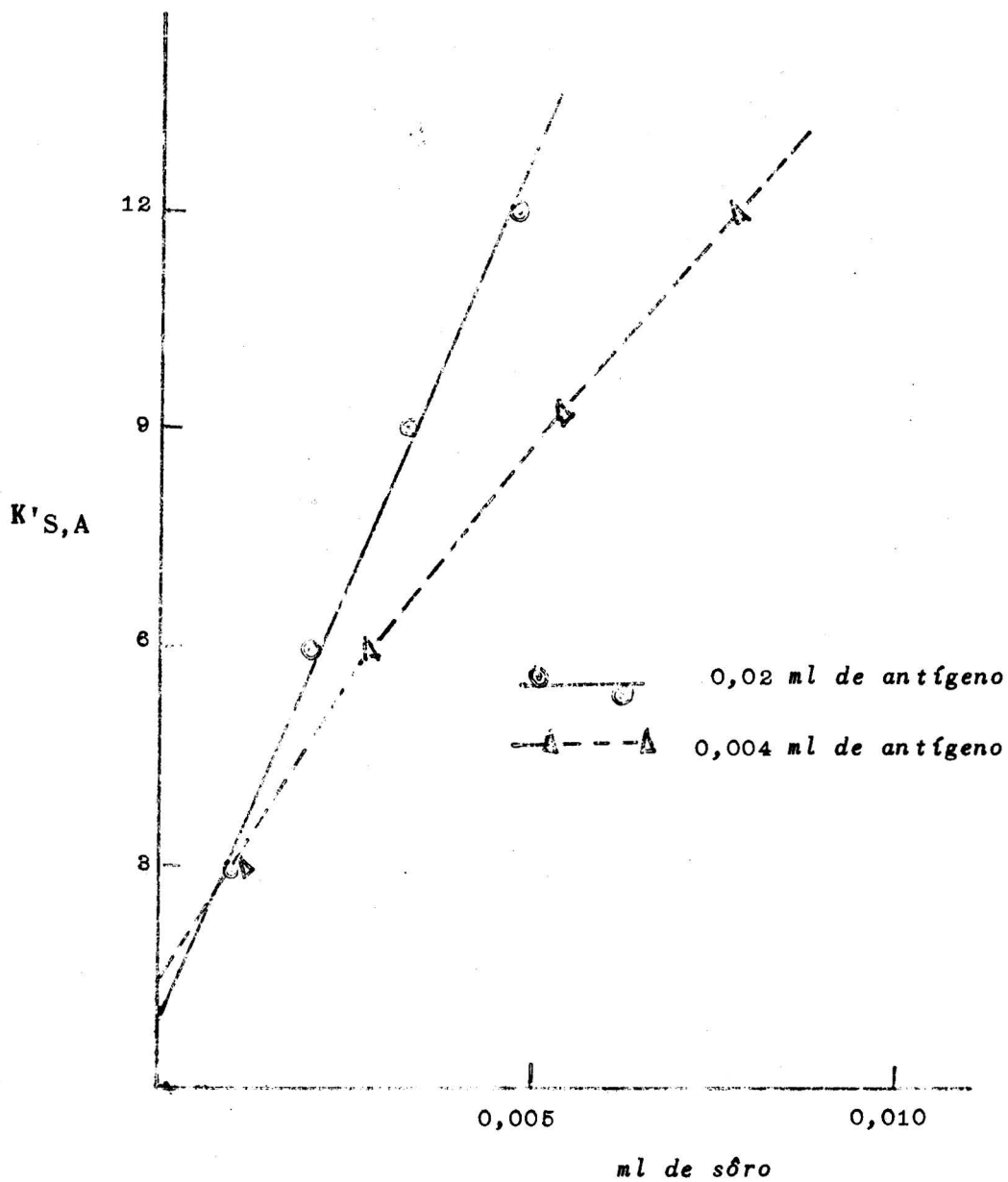
DO SÔRO (0,05 β) COM:		DO COMPLEMENTO COM:		DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1U	2U	1U	2U	
55	100	15	90	0%

Ver gráfico VIII.

GRÁFICO IX

Relação sêro-complemento. Influência da quantidade de antígeno sobre 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.



trações 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 testado. 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 todas as reações obtidas são comparadas para sempre se poder determinar a *reação máxima*.

Dessa forma, quando podemos evitar o efeito zonal do antígeno e consequentemente 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 IX onde 0,02 ml de antígeno foram suficientes para as reações com três, seis, nove e doze unidades de complemento.

O efeito do antígeno sobre as reações quantitativas com sôro de lepra é ilustrado no protocolo V e gráfico VIII, onde as linhas horizontais de isofixação mostram que maiores concentrações de antígeno têm pouco efeito sobre a reação.

As porções horizontais das curvas de isofixação do gráfico VIII tendem a se mostrar assintóticas ao eixo das abcissas; no entanto podemos verificar que, embora as linhas tenham essa tendência, preenchem 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 necessária para 50% de hemólise contra sôro, determina pontos sobre uma reta.

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

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

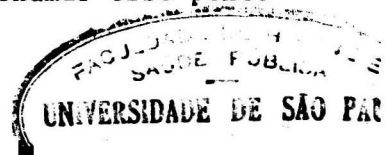
Essa relação nos vai permitir calcular os títulos de um sôro, para diferentes quantidades de antígeno.

Quando as curvas de isofixação são paralelas, o efeito do antígeno é nulo sobre a diferença entre $K'_{s,A}$; nesse caso a dose de antígeno a ser empregada numa reação poderá ter grande amplitude de variação.

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

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

cujo estudo será feito nos capítulos VIII e IX.



CAPÍTULO VIII.

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

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

$$K', A = a + b.Z$$

No gráfico IX podemos ver que o ponto foi determinado por projeção sobre o eixo do complemento, da reta traçada entre três e doze unidades. Vamos estudar o significado de *a*, utilizando os dados das linhas de isofixação do gráfico VIII, protocolo V e projetando sôro contra complemento, para duas concentrações de antígeno: 0,020 e 0,004 ml (gráfico IX). Os dados são os seguintes:

QUADRO II

Relações quantitativas entre antígeno, sôro e complemento

ANTÍGENO	ml DE SÔRO N° 124 PARA IGUAL A				VALOR DE <i>a</i>
<i>ml</i>	3	6	9	12	
0,020	0,001	0,002	0,0085	0,0047	1,0
0,004	0,001	0,0028	0,0052	0,0078	1,5

A projeção de *K'* contra sôro 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 três e seis unidades de complemento tem um valor de *a* = 1,5.

Essa observação sugere ser o ponto 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 sôro presente, antígeno sendo constante em todos os tubos da reação. As quantidades de sôro projetadas em abcissas e complemento em ordenadas são os dados de que a técnica de W. M.M. se utiliza para a determinação do título do sôro, pelo prolongamento da reta, até determinar nas ordenadas o número de unidades de complemento necessário para 50% de hemólise, quando 0,05 ml de sôro é tomado como referência.

Para haver proporcionalidade entre sôro 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 X).

O quadro III mostra os dados colhidos numa experiência desse tipo.)

QUADRO III

PARÂMETRO DAS LINHAS DE REGRESSÃO SÔRO-COMPLEMENTO, PARA DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE CARDIOLÍPINA.

ANTÍGENO CARDIO- LÍPINA	ml DE SÔRO SIFILÍTICO NECESSÁRIOS PARA K' IGUAL A:		PARÂMETROS DA LINHA DE RE- GRESSÃO SÔRO- COMPLEMENTO.	
	3	6	a	b
0,0013	0,0034	0,0080	+ 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 XI). 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 sôro fôr calculado como

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

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

A experiência é bastante ilustrativa e mostra os seguintes pontos:

1º) - 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.

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

3º) - A experiência acumulada em reações de fixação de 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 sôro, 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 sôro, sendo particularmente evidentes as mudanças ocorridas nos valores de *b*, que é a inclinação da linha de regressão sôro-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°) - 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 X podemos escolher a dose de 0,0100 de cardiolipina para reações com três e seis unidades de complemento; as doses de máxima reatividade são respectivamente 0,00075 e 0,00150, segundo *MALTANER e MALTANER*, para cardiolipina 72, experimentada. No entanto, no soro examinado, as doses de máxima reatividade foram de 0,0010 e 0,0020 ml de antígeno, respectivamente para três e seis unidades de complemento. Se a reação tivesse sido feita com as supostas doses ótimas de cardiolipina, a linha de regressão soro-complemento (ver gráfico XI) teria os seguintes parâmetros: $a = 0$, $b = 730$, com grande alteração do título do soro, pois, como se pode verificar no gráfico X, 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 XI 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°) - 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 soro.

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 as de b , da relação soro-complemento.

Até agora estudamos a inclinação da linha de regressão soro-complemento e concluímos que condições para a titulação do soro são encontra-

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

Na projeção da linha soro-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 soro, dar hemólise próxima de 50%.

Se fizermos as reações com menores quantidades de soro que aquela que reage com três unidades de complemento, podemos traçar toda a curva que relaciona soro 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 XII. 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 soro. Assim, por exemplo, quando antígeno está presente na concentração de 0,0100 ml, a fixação de complemento começa depois de 0,006 ml de soro; 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 soro.

QUADRO IV

RELAÇÃO ENTRE SORO E COMPLEMENTO, EM FIXAÇÕES COM EXCESSO DE ANTÍGENO (Exemplo: cardiolipina e soro sífilítico)

ANTÍGENO ml	SORO ml	K's, A	PARÂMETROS		TÍTULOS DO SORO (por acréscimo)
			a	b	
0,0100	0,0170	9,0	-25,5	1.500	75
0,0100	0,0150	8,0			
0,0100	0,0180	8,0			
0,0100	0,0105	2,0			
0,0100	0,0080	1,4			
0,0100	0,0080	1,2			
0,0100	0,0040	1,1			
0,0100	0,0020	1,1			
0,0100	salina	1,1			
0,0088	0,0108	9,0			
0,0088	0,0088	8,0			
0,0088	0,0088	8,0			
0,0088	0,0055	2,0			
0,0088	0,0040	1,8			
0,0088	0,0080	1,2			
0,0088	0,0020	1,1			
0,0088	salina	1,1			

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 sêro, o valor de a tende para 1,0; nessas condições a fixação do complemento se inicia com quantidades mínimas de sêro 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 sêro e complemento pode ser alcançada, porém a inclinação não é a mesma e o ponto a , determinado geomêtricamente, sempre é maior que 1,0 (gráfico XI).

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

Difere da técnica de WADSWORTH, MALTANER e MALTANER pois o título do sêro é avaliado em termos da inclinação que a linha de regressão sêro-complemento possui, para um valor determinado de sêro, arbitrariamente tomada 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.

GRÁFICO X

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

Curvas com 3 e 6 unidades de complemento.

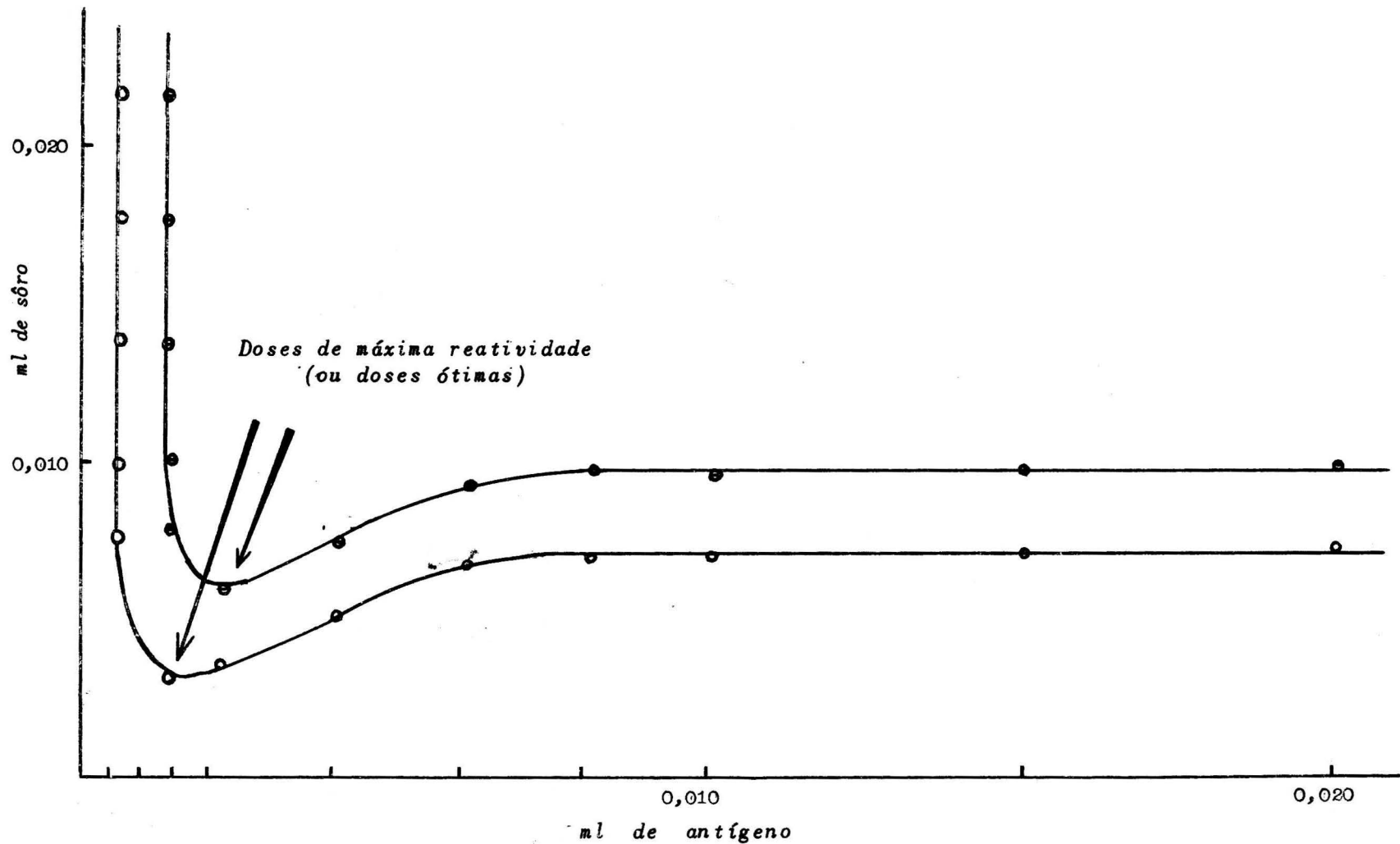


GRÁFICO XI.

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

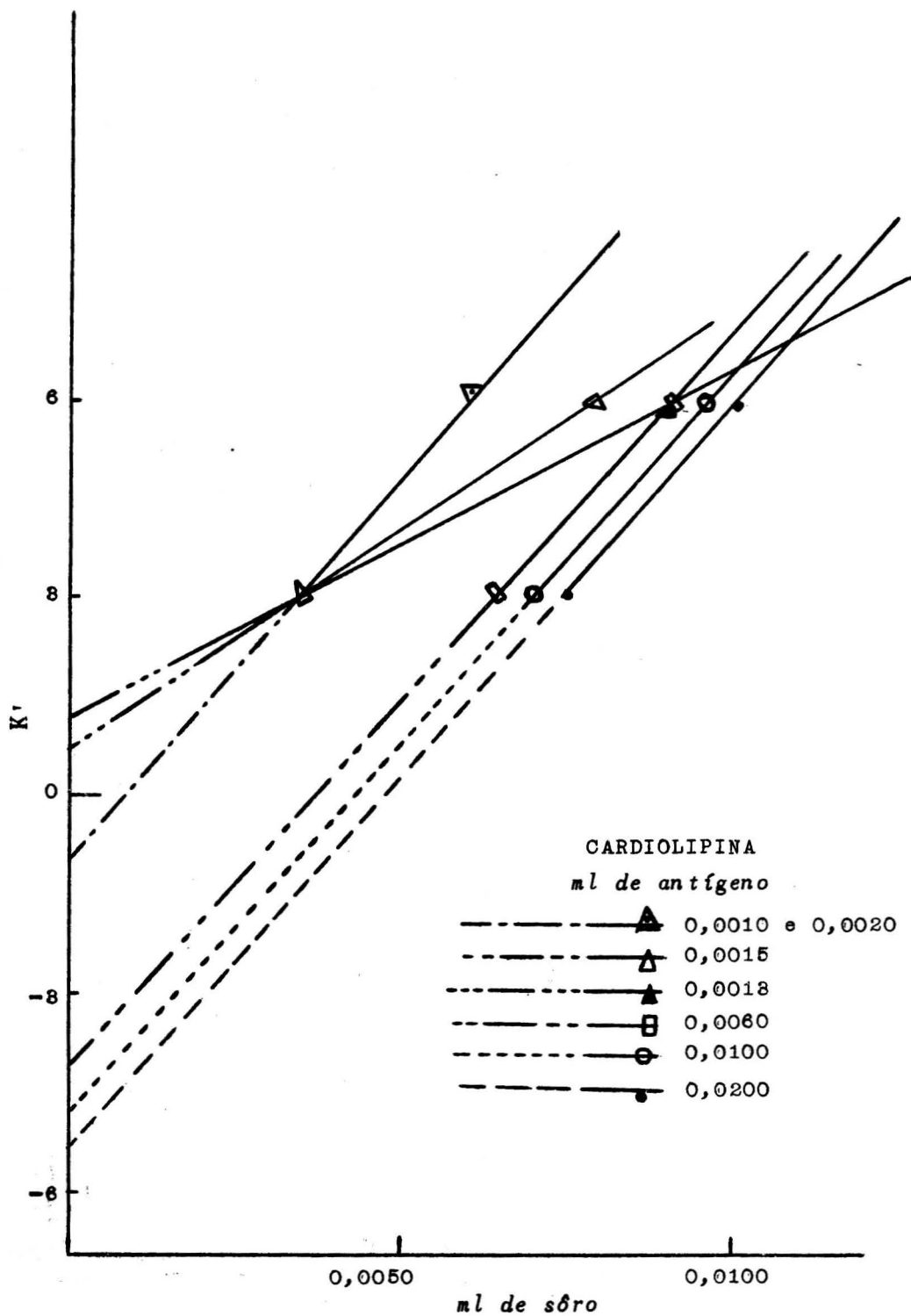
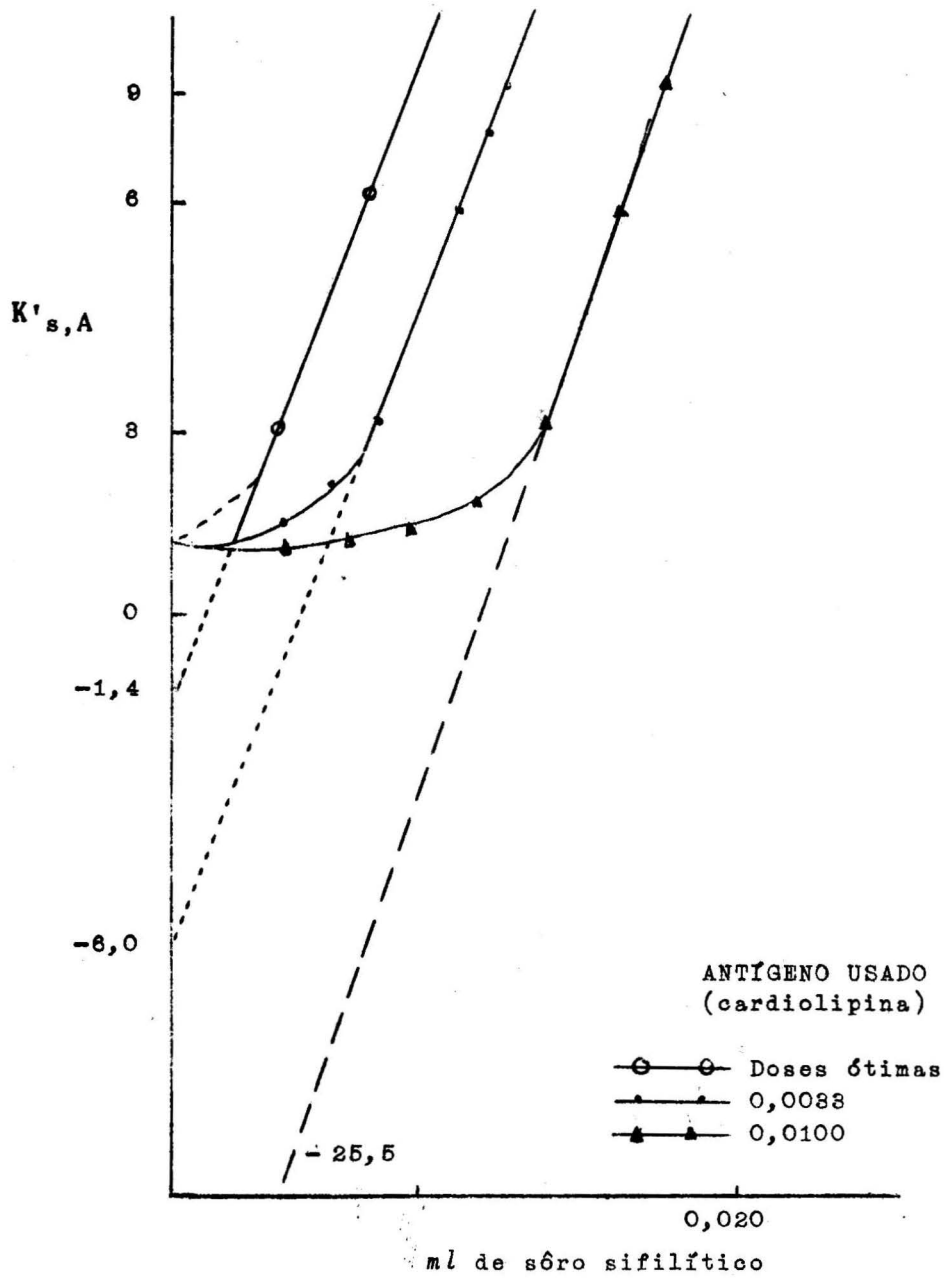


GRÁFICO XII

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



CAPÍTULO IX

ANTÍGENOS AQUOSOS DO BACILO DA TUBERCULOSE. EFEITOS SOBRE O COMPLEMENTO. ANTÍGENOS A- QUOSOS LECITINADOS.

Antígenos aquosos preparados do bacilo da tuberculose, como descritos no capítulo II, ou preparados por simples ebulição de bacilos em água destilada, apresentam 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 testados são utilizados. Cabe aqui um reparo sobre 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 anticomplementariedade 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 sêro humano normal na reação diminui o efeito zonal e o desloca (protocolo VII), porém não o evita.

O sêro 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 contrôles do antígeno; enquanto antígenos concentrados não se mostram anticomplementares (diluições a 1:5 e 1:10), quando diluídos são capazes de fixar mais de duas unidades de complemento, na ausência de sêro. 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. É 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 XIV).

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

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

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 no capítulo X onde faremos um estudo comparativo entre antígenos solúveis em piridina e antígenos aquosos.

PROTOCOLO VI

Ação anticomplementar do antígeno aquoso não lecitinado, em presença de solução salina boratada.

ANTÍGENO 28 (OB)

DILUIÇÃO DO ANTÍGENO N° 28(OB)	COMPLEMENTOS LIOFILISADOS; PARTIDAS NUMERADAS											
	N° 1			N° 2			N° 3			N° 4		
	HEMOLISE % 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	20	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° 5			N° 6			N° 7			N° 8		
1:5	20	95	100	15	90	100	25	90	100	40	95	100
1:10	30	95	100	15	75	100	20	80	65	35	80	95
1:20	20	85	95	0	35	40	15	30	85	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:		CONTROLE DO COMPLEMENTO	
		1 U	2 U
N° 1	28.9.51	45%	100%
N° 2	20.4.51		
N° 3	27.4.51	DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS	
N° 4	10.1.52		
N° 5	8.10.52		
N° 6	26.9.52		
N° 7	4.5.51		
N° 8	6.10.52	0%	

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													
	SORO 1			SORO 2			SORO 3			SORO 4			SALINA	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
5	85	90	100	85	90	100	85	100	100	20	65	95	85	100
10	15	60	90	25	90	100	15	70	100	15	70	100	80	90
20	0	65	90	20	85	100	0	40	100	25	75	95	25	55
40	0	80	100	20	80	100	0	50	100	20	80	100	15	25
66,7	10	90	100	25	85	100	0	60	100	20	75	100	0	20
100	15	90	100	25	90	100	0	85	100	25	80	100	0	20
125	15	100	100	25	90	100	10	85	100	20	80	100	0	25
167	20	100	100	20	100	100	15	90	100	25	85	100	0	35
250	25	100	100	30	85	100	25	100	100	25	90	100	10	50
388	30	90	100	30	85	100	25	100	100	25	90	100	10	65
500	30	90	100	35	95	100	30	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

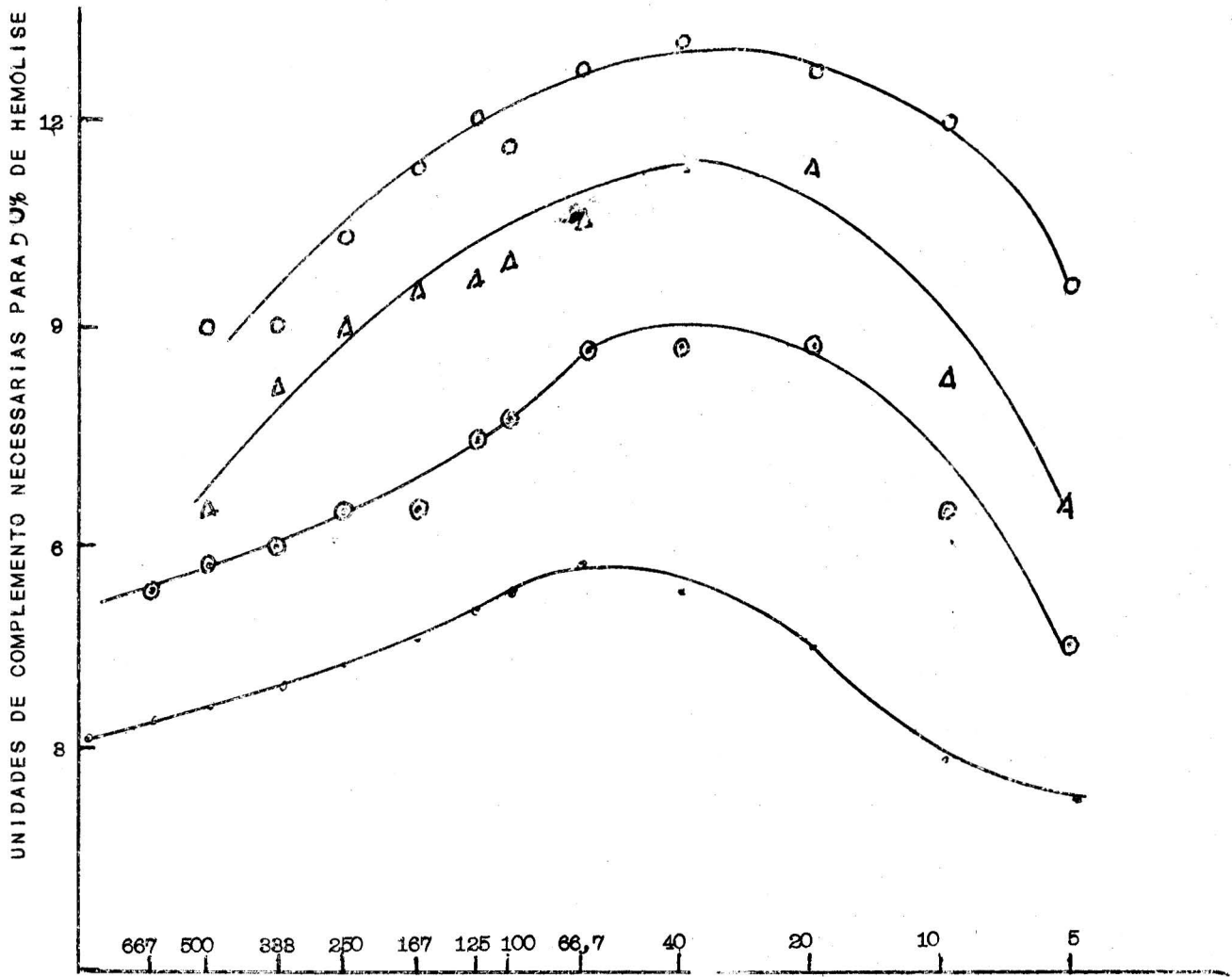
PROTOCOLO VIII (Gráfico XIII)

Reações com antígeno aquoso sem lecitina 28(OB) e soro de lepra n.º 8954

ANTÍGENO DILUÍDO	SORO 8954 DILUÍDO A:					CONTROLE DO ANTÍGENO		
	125		41,7		25			
	UNIDADES DE COMPLEMENTO					1	2	3
	3	6	6	9	12			
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	85
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
1:388	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 XII.

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

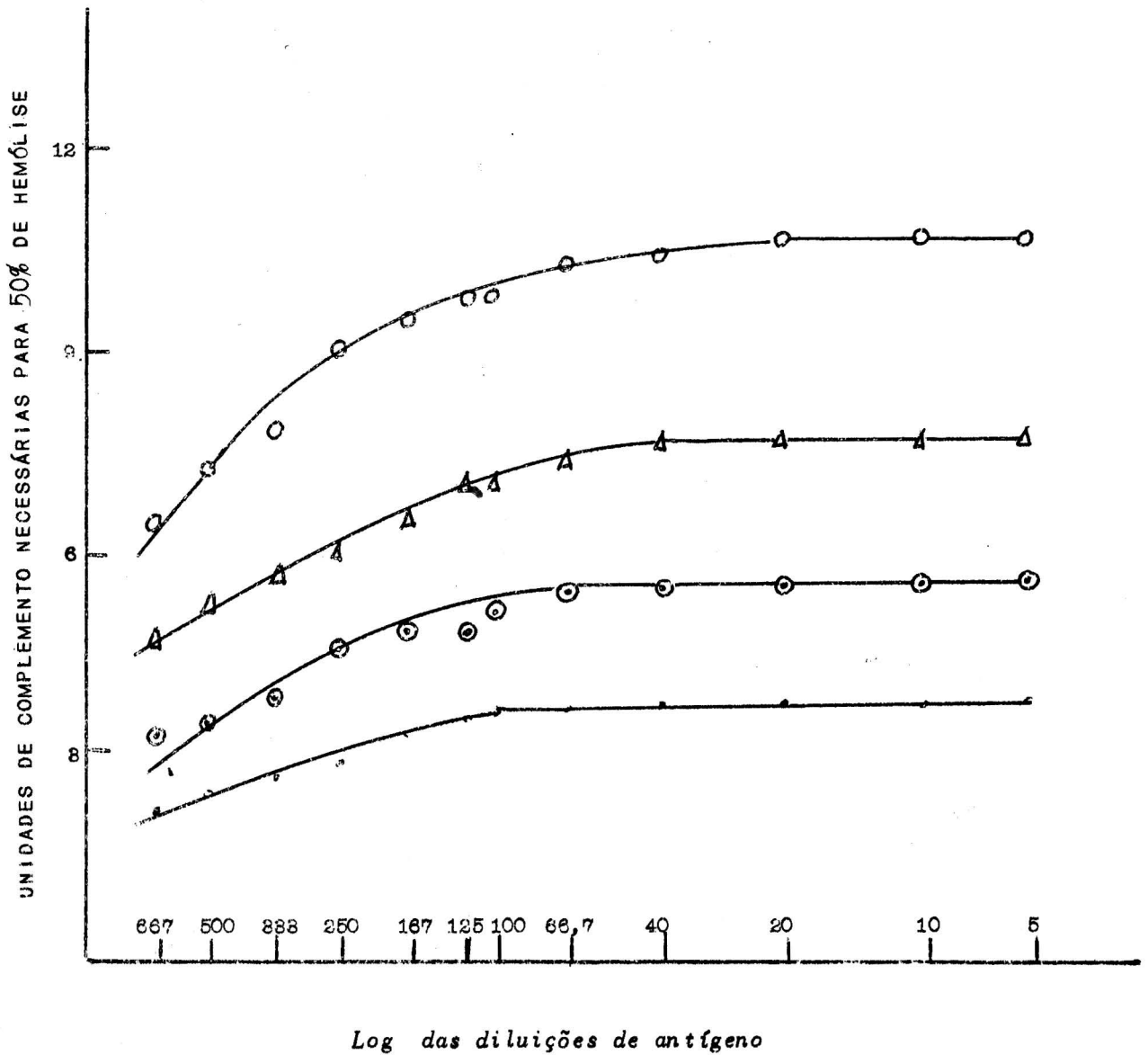


log das diluições de antígeno 28 (OB)

- sêro n° 8954 diluído a 1:16,7
- △— sêro n° 8954 diluído a 1:25
- sêro n° 8954 diluído a 1:41,7
- sêro n° 8954 diluído a 1:125

GRÁFICO XIV

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



- ————— sêro n° 8954 diluído a 1:16,7
- △ ————— sêro n° 8954 diluído a 1:25,0
- ⊙ ————— sêro n° 8954 diluído a 1:41,7
- ⊠ ————— sêro n° 8954 diluído a 1:125

PROTOCOLO IX (Gráfico XIV)

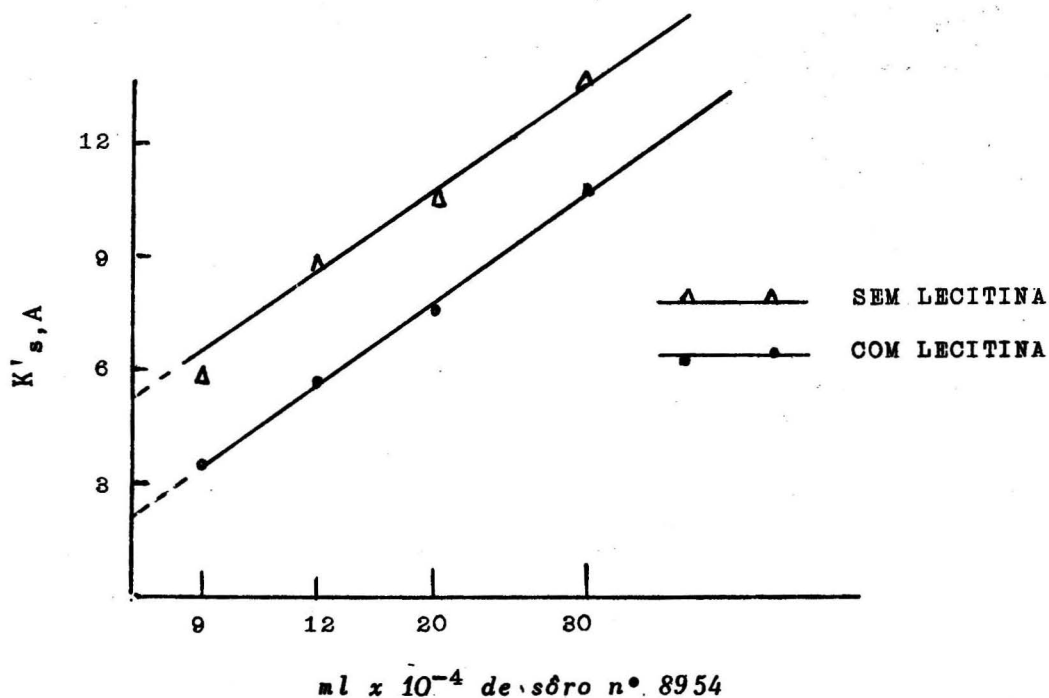
Reações com antígeno aquoso 28(OB) lecitinado a 0,05% (Método II) e sêro de lepra n°. 8954.

DILUIÇÃO DO ANTÍGENO	SÔRO 8954								CONTROLE DO ANTÍGENO		
	1:125		1:41,7		1:25		1:16,7				
	UNIDADES DE COMPLEMENTO								1	2	8
	8	6	8	6	6	9	9	12			
5	25	100	0	70	20	75	80	70	85	80	100
10	25	100	0	70	20	75	80	70	85	80	100
20	25	100	0	70	20	75	80	70	40	75	100
40	25	100	0	70	15	75	85	75	85	70	100
66,7	25	100	0	70	20	80	85	75	25	75	100
100	25	100	0	80	25	85	45	80	20	80	100
125	80	100	0	85	25	85	40	80	80	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
388	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	85	100	100
1000	100	100	50	100	90	100	100	100	85	100	100
CONTROLE DO COMPLEMENTO									25	95	100

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

GRÁFICO XV

Linearidade entre sêro e antígeno, com ou sem lecitina.



CAPÍTULO X

EFEITO DA LECITINA SOBRE 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 leproso 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 comportamento da lecitina 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 sobre 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 aquelas 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 sobre lecitina comercial. Soros preparados com lecitina comercial não reagem com lecitina purificada.

Os preparados purificados poderiam 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 cardioplipina, 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 sêro 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 cardiolipina e com título 100. Era uma mistura de soros de leproso, com sorologia para sífilis positiva e com história de infecção luética.

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 os seguintes métodos de dispersão:

Método I - A solução do antígeno em benzeno é evaporada e o resíduo suspenso em salina. A lecitina é juntada à solução benzênica. É o método utilizado por WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN.

O inconveniente 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, e se assemelha ao empregado em cardiolipina.

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. Isotonizar com NaCl.

O antígeno HA-5 solúvel em piridina e lecitinado pelos métodos I, II e III apresentou respectivamente as seguintes turvações, lidas em KLET, com filtro azul: 259, 230 e 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 XVI, XVII e XVIII.

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 XVIII).

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 XVIII 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 foram 6000 e 3241 respectivamente para os antígenos HA-5 e W.K.K. (protocolo XIII, gráfico XIX).

Quantidades maiores que 0,05% de lecitina diminuíram a intensidade da reação. O protocolo XIV e gráfico XX mostram a titulação de um soro de lepra (N° 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 sêro a influência da quantidade de lecitina sôbre o título não foi tão marcada, embora se pudesse verificar que a dose ótima de lecitina estava em redor de 0,05% (protocolo XV e gráfico XXI).

O gráfico XXI traduz uma dosagem de antígeno, diversamente lecitinado. Observar o alto valor de α que depende da quantidade de sêro presente, como vimos anteriormente ao tratarmos do ramo vertical das curvas de isofixação em lepra.

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 anticomplementar 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 responsável pelo comportamento dos diversos antígenos, pois foram todos preparados do mesmo lote de bacilos.

O protocolo XVII mostra uma série paralela de reações. O antígeno W.K.K. foi preparado segundo o método de WITEBSKY ET AL, porém a extração dos bacilos foi feita com a mistura álcool-éter-água. Fraca atividade antigênica indica o método desaconselhável, pois provas anteriores (protocolo XVI) indicaram ser o antígeno W.K.K. preparados de bacilos do lote TB 48189, bastante ativo. O antígeno aquoso HA-5AA 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 X.

Influência produzida pelo modo de se juntar lecitina em antígenos não filtrados. (Gráfico XVI)

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

ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO III										
3 U	70	60	60	65	50	50	85	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
8 U	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100

CONTRÔLES

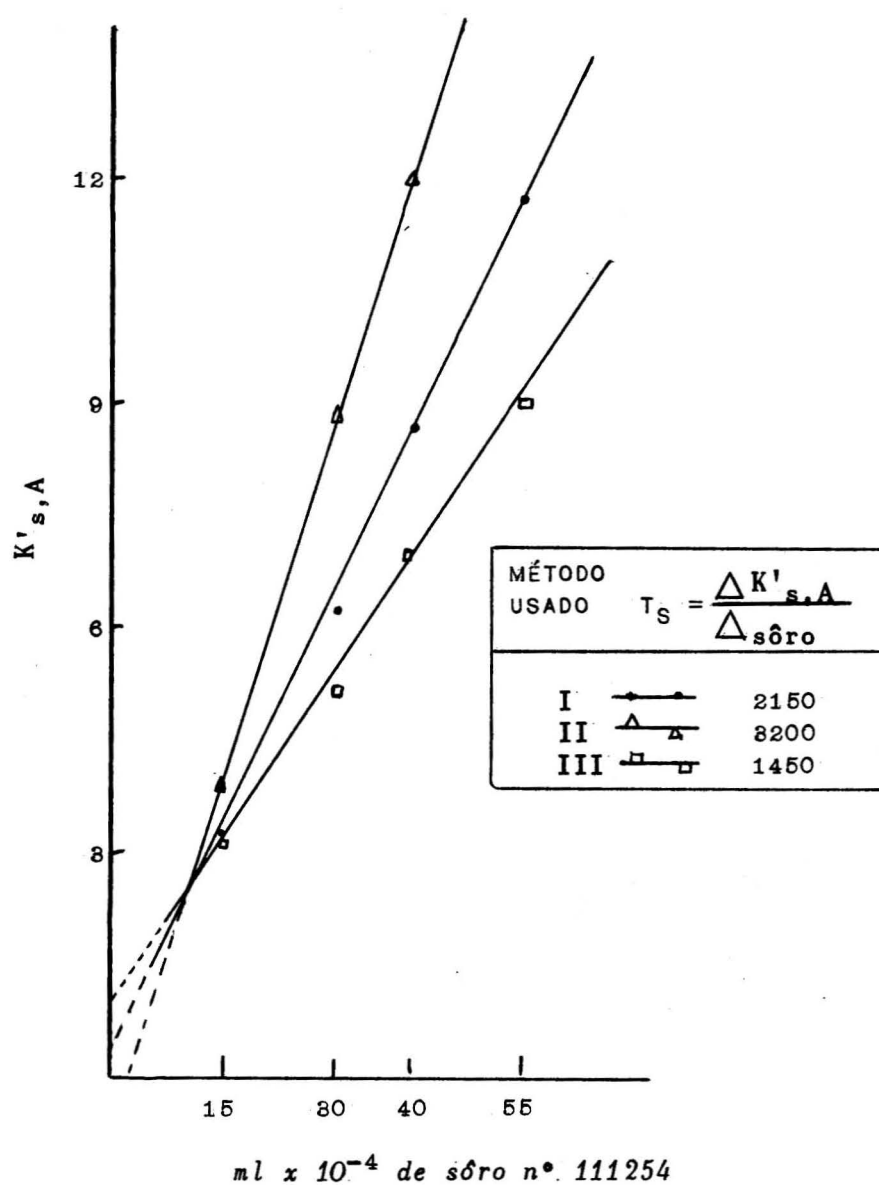
DO COMPLEMENTO COM:			DO SÔRO (111254) COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	8 U	1 U	2 U	8 U	
15	70	95	45	100	100	0%

OBSERVAÇÃO:

As quantidades de sêro 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.

GRÁFICO XVI.

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



PROTOCOLO XI.

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

COMPLEMENTO	ANTÍGENO HA-5 FILTRADO $ml \times 10^{-8}$.									
	ANTÍGENO LECITINADO PELO MÉTODO I									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
8 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

8 U	25	25	80	25	25	80	40	40	40	70
6 U	80	85	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

8 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	8 U	1 U	2 U	8 U	
15	80	100	45	100	100	0%

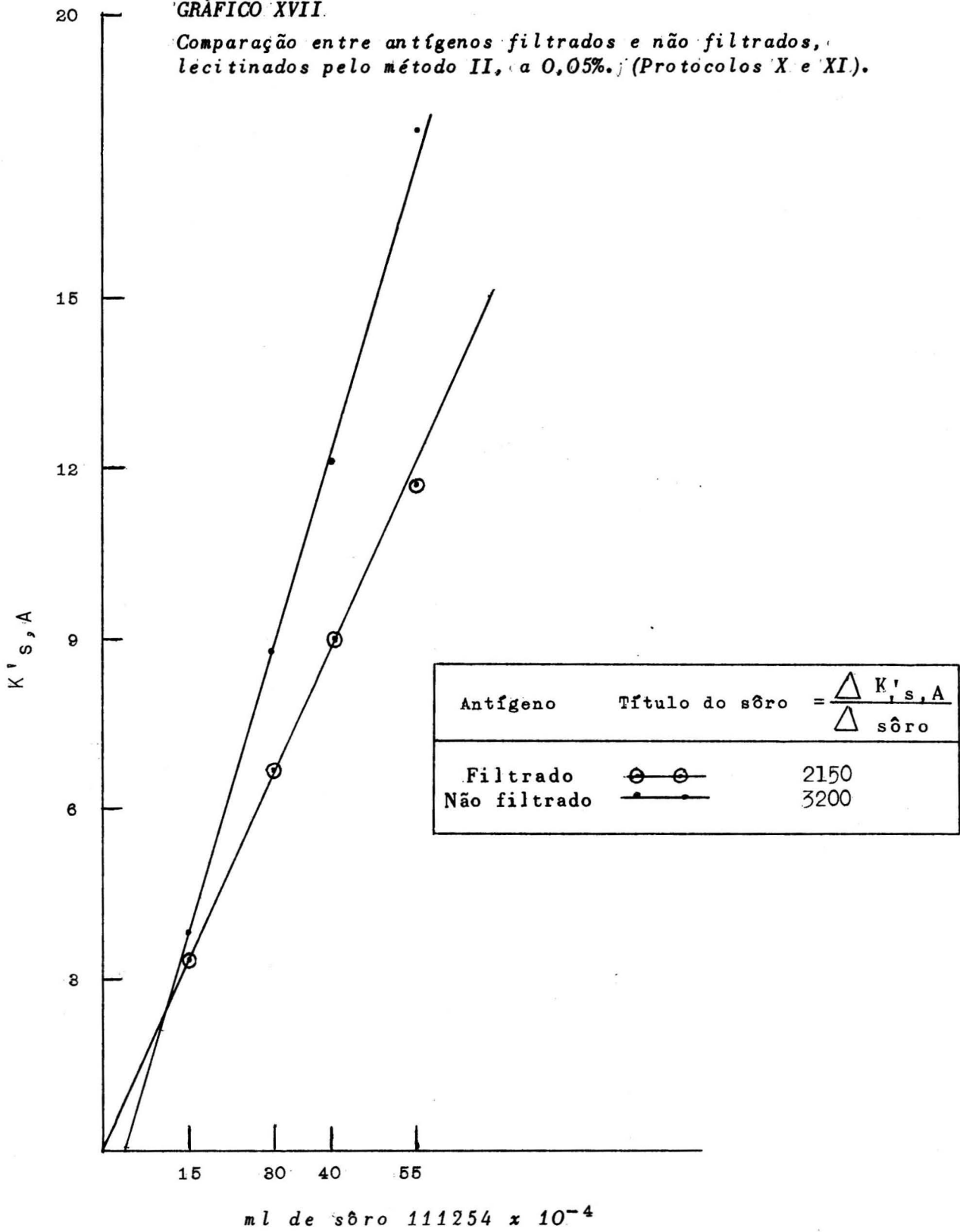
OBSERVAÇÃO: foram usadas as mesmas diluições do sêro 111254, do protocolo X.

As condições da experiência foram as mesmas que descritas no protocolo X.

Os resultados das titulações (protocolos X e XI) são apresentados no gráfico XVII.

GRÁFICO XVII.

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



PROTOCOLO XII.

Efeito de diferentes doses de lecitina sobre a reação de fixação do complemento com sêro de lepra nº 111254 (Gráfico XVIII).

COMPLEMENTO	ml DE ANTÍGENO HA-5 x 10 ⁻⁸									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
	Antígeno lecitinado a 0,025% (método II)									
8 U	85	40	35	35	35	35	50	45	50	60
6 U	80	30	20	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% (método II)										
8 U	85	80	80	35	80	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	85	80	35	35	35	40	50	55	50	55
Antígeno lecitinado a 0,075% (método II)										
8 U	85	80	40	40	85	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	85	80	30	40	35	35	40	45	45	55
Antígeno W.K.K. + 0,05% de lecitina (método II)										
8 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

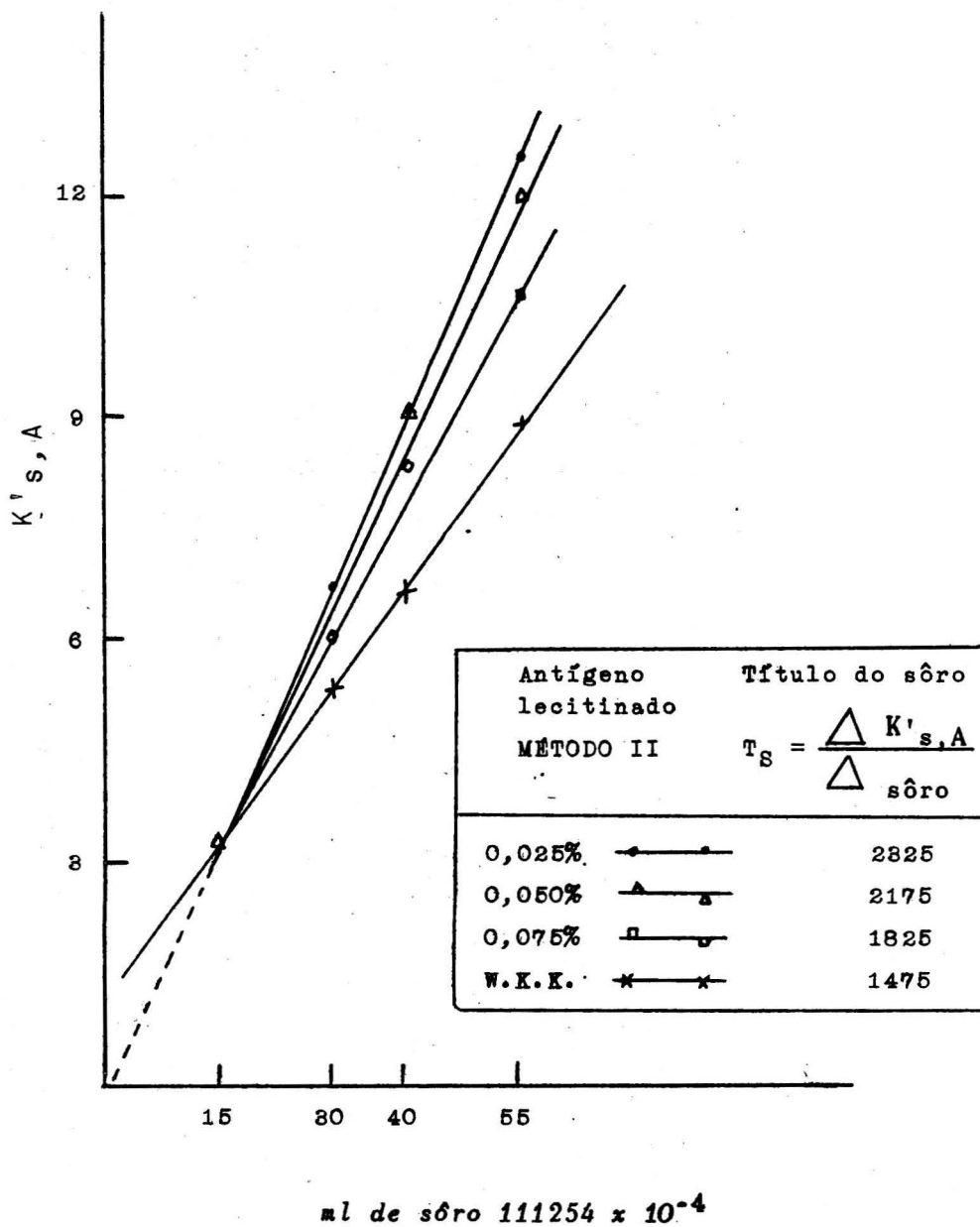
CONTRÔLES

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 sêro 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 XVIII.

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



PROTOCOLO XIII.

*Comparação de dosagens de antígenos lecitinados pelo método II.
(Gráfico XIX)*

COMPLEMENTO	ml de antígeno x 10 ⁻⁴ (HA-5 + 0,05% lecitina)									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
8 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	85	60	55	45	50	50	60	65	55	55
8 U	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ANTÍGENO W.K.K. + 0,05% DE LECITINA

8 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	30	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 U	35	35	45	40	40	40	45	45	55	55
8 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 sêro de lepra f11254 não diluído.

Incubação preliminar: 90 minutos a 37°C

Incubação de hemólise: 15 minutos a 37°C

GRÁFICO XIX

DOSAGEM DE ANTÍGENOS LÉCITINADOS A 0,05% EM PRESENÇA DE SORO DE LÉPRA (PROTÓCOLO XIII)

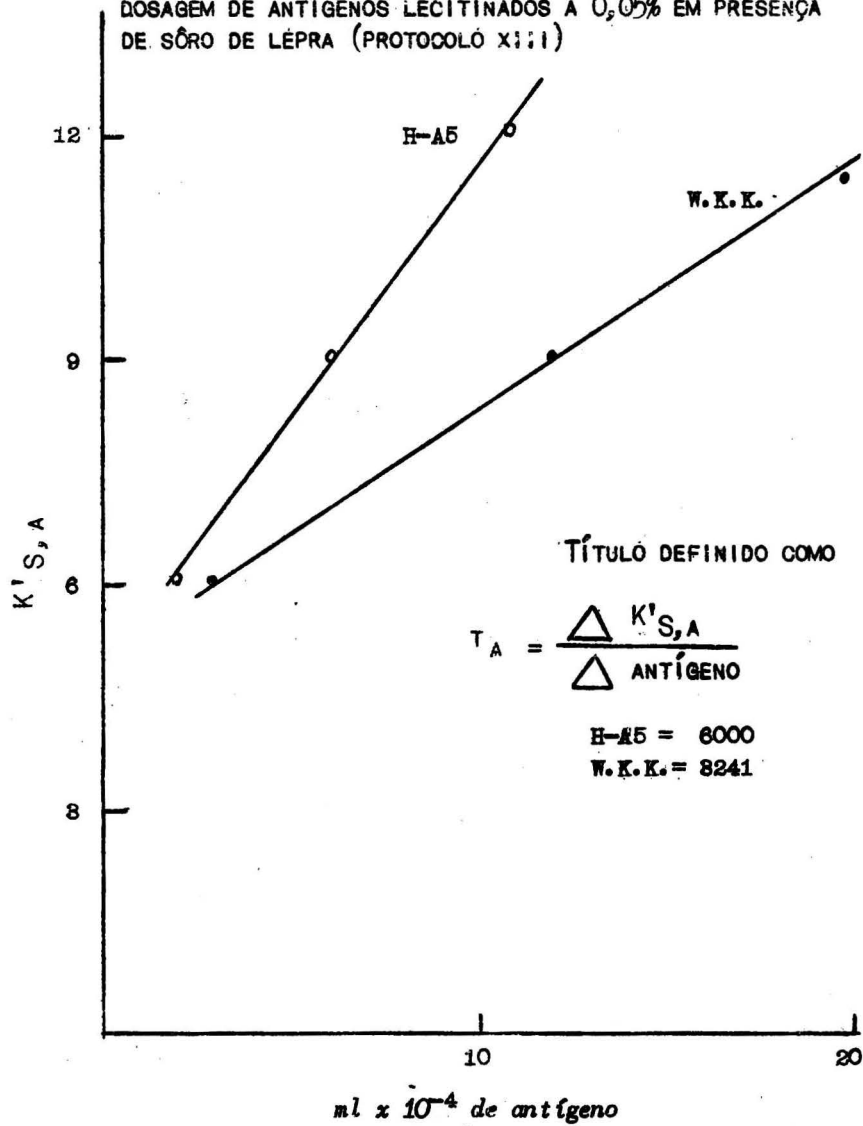
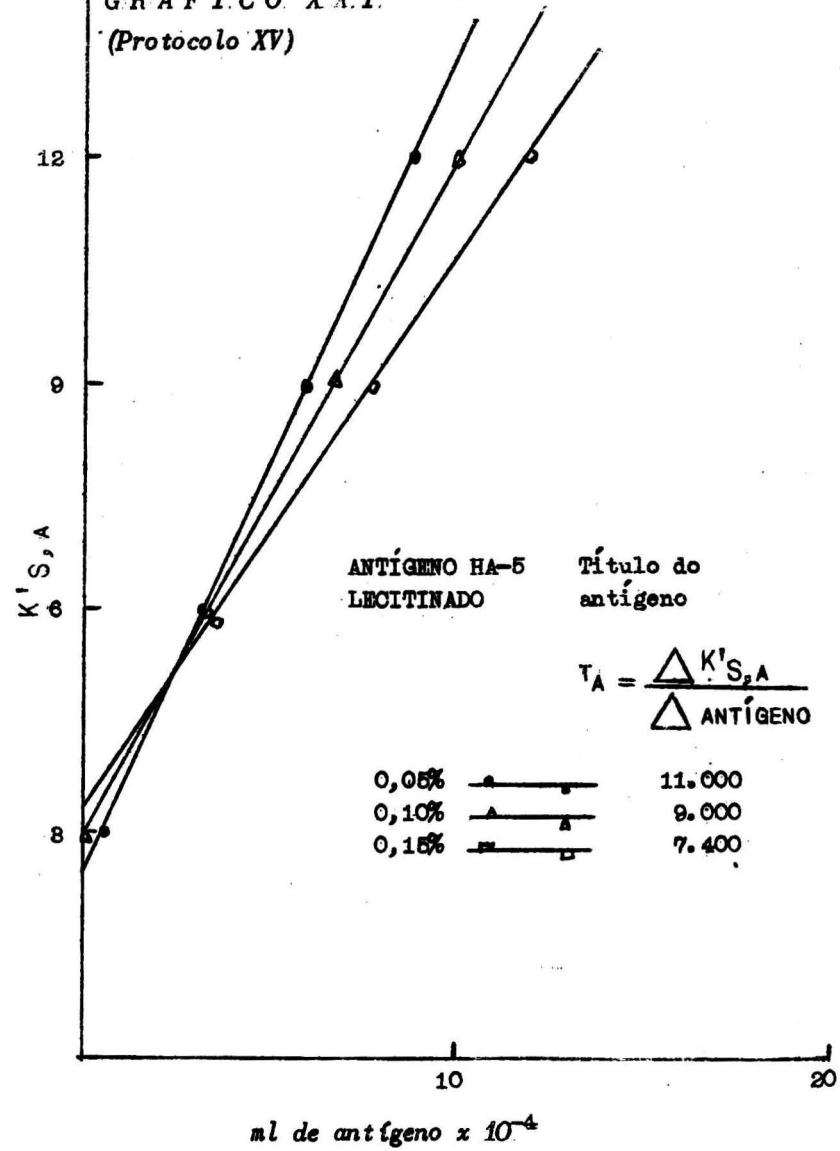


GRÁFICO XXI

(Protocolo XV)



PROTOCOLO XIV

Efeito da lecitina sobre os títulos de soro de lepra n.º 111 (Gráfico XX)

COMPLEMENTO	ml DE ANTÍGENO X 10 ⁻⁸									
	20	16	12	10	8	6	4	3	2	1
	HA-5 + 0,05% DE LECITINA									
3 U	85	85	85	80	80	85	85	55	50	60
6 U	40	40	85	50	50	50	60	70	90	100
9 U	85	40	40	40	55	70	80	100	100	100
12 U	80	85	80	80	80	85	40	60	90	100
2 U	45	40	85	85	85	80	85	85	40	50

HA-5 + 0,10% DE LECITINA										
3 U	85	85	80	80	85	80	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	80	85	40	40	85	85	85	40	80	85

HA-5 + 0,15% DE LECITINA										
3 U	50	85	85	80	85	85	85	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	85	80	85	85	85	45	50	50	50

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SORO 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.

PROTOCOLO XV

Influência da quantidade de lecitina na dosagem do antígeno HA-5, em presença de sêro 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									
8 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	85	80	25	40	40	40	85	35	40	80

HA-5 + 0,10% de lecitina

8 U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80
6 U	0	0	0	0	0	80	50	80	100	100
9 U	0	0	15	85	70	90	100	100	100	100
12 U	15	25	50	85	80	90	100	100	100	100
2 U	20	25	25	20	25	80	85	30	80	85

HA-5 + 0,15% de lecitina

8 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

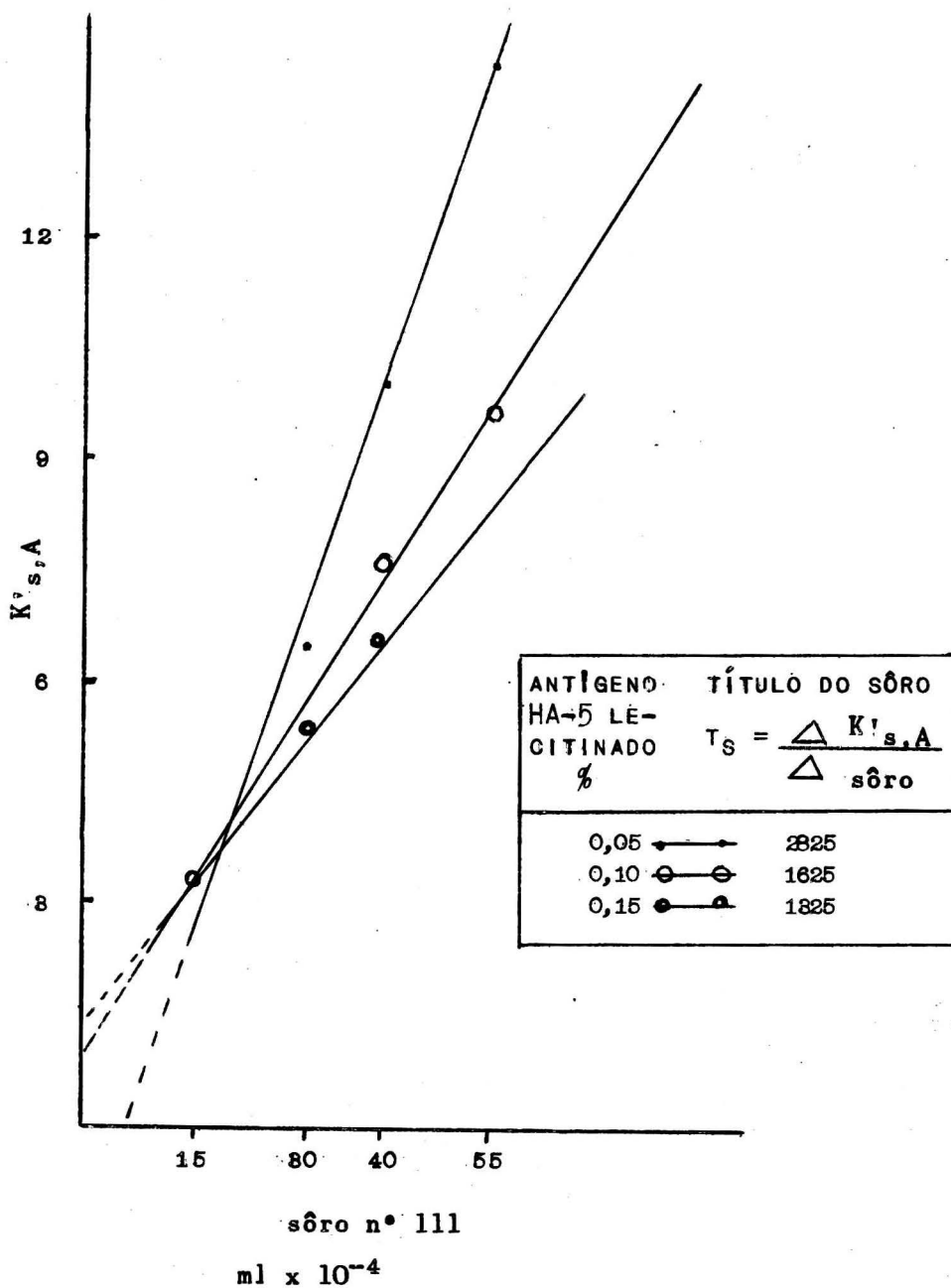
CONTRÔLES

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 XXI são projetadas as quantidades de antígeno necessárias para 50% de hemólise quando sêro não diluído está presente com três, seis, nove e doze unidades de complemento.

GRÁFICO XX

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



PROTOCOLO XVI

Comparação de antígenos

DIL.	ANTÍGENOS														
	HMC-27			W.K.K. sem lecitina			W.K.K. + lecitina			28 (OB) total			28 (OB) reprecip.		
	UNIDADES DE COMPLEMENTO														
	2	3	6	2	3	6	3	3	6	2	3	6	2	3	6
1	0	0	0	35	35	0	55	35	0	0	40	35	20	30	60
1,67	0	10	0	30	35	0	35	90	0	0	35	30	35	35	25
5,9	15	20	0	75	30	0	35	100	0	25	65	10	60	100	0
10	15	25	0	65	30	0	35	100	0	40	75	0	60	100	0
16,7	15	50	0	45	30	0	60	100	0	45	35	20	60	100	0
50	40	100	100	60	100	70	30	100	20	75	100	100	65	100	100
100	75	100	100	70	100	100	60	100	45	75	100	100	65	100	100
167	70	100	100	70	100	100	60	100	35	80	100	100	70	100	100
500	30	100	100	35	100	100	65	100	100	30	100	100	70	100	100

CONTRÔLES

DO COMPLEMENTO COM:			DO SORO COM:			DAS HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	3 U	
15	30	100	35	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 controles do antígeno. O tubo reação é feito com 6 unidades de complemento.

PROTOCOLO XVII.

Comparação de antígenos em testes com 6 unidades de complemento

D I L.	ANTÍGENOS											
	W.K.K.-AP			HA-5-AA			28 (OB)-S			28 (OB)-1		
	UNIDADES DE COMPLEMENTO											
1:	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 HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS
1 U	2 U	3 U	1 U	2 U	
15	80	100	45	100	0%

Os tubos com 2 e 3 unidades contêm 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.)

PRÓTOCOLO 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	80	0	0	0	0	0	10	0
1,67	20	80	0	0	80	0	0	0	0	0	15	0
5,0	20	75	0	0	80	0	25	60	0	20	65	0
10	30	80	0	0	20	0	80	70	0	20	75	0
16,7	30	85	0	15	40	0	80	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 SORO 322 DIL. A 1:5 EM SORO 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 WITEBSKY, 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 anticomplementar do antígeno.

CAPÍTULO XI

FATORES 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 (*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, mesmo em excesso. Essa quantidade de antígeno produzirá reações máximas com as doses de complemento empregadas, desde que sôro 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.

Se x é o número de unidades de complemento 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):

$$\log x = \log K + h \cdot \log (y/1-y)$$

onde h e K são parâmetros.

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 com o quociente:

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

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 quan-

tidade 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 gráficamente se conhecermos dois pontos:

$$(x_1y_1) \quad e \quad (x_2y_2)$$

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

Os dois pontos estarão sobre uma reta que cortará a abscissa 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 soro. Nessas condições é necessário se ter o conhecimento do valor de h para o sistema em teste. Esse valor de h seria a média dos valores obtidos em uma série de titulagens nas quais se mantinham constantes todas as condições (volume, temperatura, concentração de antígeno, número de unidades de complemento) variando apenas o soro.

Se a reação for 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 desses *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 pequeno, 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 sêro pela técnica quantitativa de *WADSWORTH, MALTANER e MALTANER*.

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 êsses 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 de *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.

No capítulo I, definimos *h* segundo as duas escolas de fixação de complemento. Para *W.M.M.* *h* se refere à inclinação da linha de regressão logarítmo 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 sêro, 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.

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 os seguintes valores: $h = 0,08$ e $K's, A = 10,0$ (Protocolo XIX).

Se no entanto em tubos duplicados e em volumes maiores, em vez de adicionarmos hemácias sensibilizadas diretamente ao tubo reação, fizermos a dosagem do complemento residual (técnica de *MAYER ET AL.*), obtaremos 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 sêro de lepra e antígeno HA-5 lecitinado a 0,05%.

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).

QUADRO V

Valores de h em fixação de complemento no sistema lepra, quando o mesmo complexo imune reage com diferentes quantidades de complemento.

TUBO	UNIDADES DE COMPLEMENTO				
	PRESENTES	LIVRES	FIXADAS	FIXAÇÃO %	H_V
1	12,2	8,0	9,2	76	0,24
2	11,4	2,8	9,1	80	0,27
8	10,7	1,9	8,8	82	0,28
4	10,0	1,8	8,7	87	0,29
5	9,8	0,94	8,4	90	0,37
6	8,8	0,61	8,2	92	0,40

O complemento residual pode 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 0,20, \pm 0,02.

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.

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.

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 Nº	HEMÓLISE %	UNIDADES DE COMPLEMENTO				
		PRESENTES	LIVRES	FIXADAS	H_X	H_V
8	90	10,7	1,9	8,8	0,08	0,28
4	70	10,0	1,8	8,7		0,29
5	45	9,8	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 XXII) ao estudarmos o protocolo XIX, descrito com todos os detalhes, em vista da aparente complexidade do assunto.

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

PROTOCOLO XIX

Em tubos de 15 x 150 mm foram misturados:

Antígeno HA-5 1:10	1,0 ml
Sêro 8954 dil. a 1:25	0,5 ml
Complemento (*)	1,0 ml
Solução salina	0,5 ml

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

Foram mantidas as mesmas proporções utilizadas na técnica de W.M.M.; assim como o volume relativo de cada um dos elementos previamente testados em prova preliminar.

O complexo antígeno-anticorpo formado nas proporções indicadas tinha sido capaz de fixar 10 unidades quando 12 estavam presentes. Depois da incubação preliminar de 90 minutos a 37°C, em banho-maria, pipetamos diversos volumes até um máximo de 0,3 ml em tubos de 12x75 mm. Completado o volume para 0,3 ml com salina, 0,2 ml de hemácias sensibilizadas foram juntadas. Depois de 15 minutos de hemólise, a 37°C, os tubos receberam 1,0 ml de salina gelada e foram lidos em fotômetro, depois de centrifugados.

O quadro VII mostra os resultados obtidos.

O tubo contendo 0,3 ml da mistura corresponde exatamente àquele montado para a determinação dos fatores de conversão pela técnica de W.M.M., e ao mesmo tempo faz parte de uma curva hemolítica que mede o complemento livre (técnica de *MAYER ET AL.*).

A curva hemolítica dos fatores de conversão é formada pelas hemólises parciais obtidas com cada um dos tubos contendo 0,3 ml da mistura (curva A do gráfico XXII). Convém lembrar que êsses tubos se diferenciam apenas pela quantidade de complemento inicialmente presente; cada um dêles, por sua vez, faz parte de uma curva da qual êle é o tubo que contém mais complemento livre, por ter o maior volume (0,3 ml). Cada uma dessas curvas de dosagem de complemento residual está representada no gráfico XXII (curvas B, C, D, E, F e G).

As curvas hemolíticas de B a G (gráfico XXII) obtidas pela projeção de logaritmos de volume da mistura antígeno, anticorpo e complemento, contra logitos de hemólise, possuem inclinações (h_y) 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 vêzes necessita ser calculada por extrapolação gráfica (curvas E e G).

Como acabamos de ver, não se pode comparar h_x com h_y pois são parâmetros de curvas traçadas em diferentes condições; h_x tem como numerador $\Delta \log$ de complemento inicialmente presente; h_y 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 $h_x = h_y$. 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. É 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.

FATORES DE CONVERSAO PARA LEPRO

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

A tabela II 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 XXII ilustra um nomograma 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° 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 aplicado com o mínimo de computações e cálculo, empregando a tabela construída para a determinação de h_x quando a progressão 0,9 de complemento é usada.

Para o cálculo 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 , sua posição não tem influência pois as diferenças entre os logaritmos das concentrações são iguais.

OBSERVAÇÃO: a técnica original empregada por *WADSWORTH, MALTANER e MALTANER* para o preparo de soluções de complemento, foi substituída por outra que faz as soluções à partir do complemento não diluído. Esse método tem a vantagem intrínseca de não propagar geomêtricamente erros de pipetagem proveniente de tubos anteriores. No exemplo do quadro VII, as soluções de complemento empregadas foram preparadas mantendo-se porém a progressão geométrica de razão 0,9.

Exemplo:

QUADRO VIII

NÚMERO DO TUBO DE COMPLEMENTO	DETERMINAÇÃO DE H_x , EMPREGANDO A TABELA I		
	HEMÓLISE %	$x'Y'$	Y'
	Y	(TABELA 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:

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

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

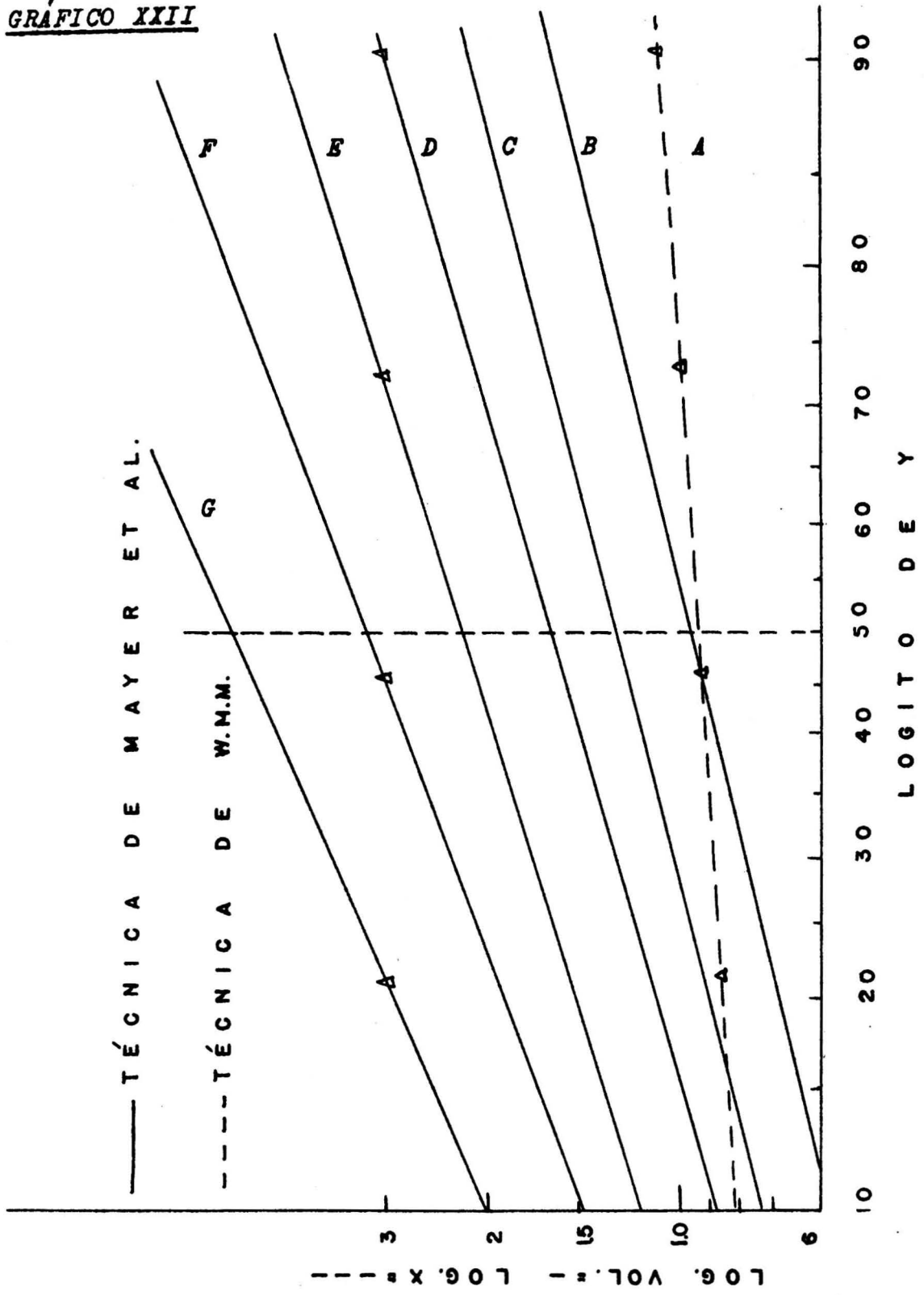
QUADRO VII.

VOLUMES DA MISTURA ANTÍGENO, ANTICORPO E COMPLEMENTO	HEMÓLISE % NOS TUBOS CONTENDO: COMPLEMENTO:						
	12,2	11,4	10,7	10,0	9,8	8,8	
	CURVAS N.ºS						
	B	C	D	E	F	G	
0,07	22-23						
0,08	32-31						
0,09	42-45						
0,10	51-52	27-27	15-18				
0,11	62-62	38-38					
0,12	70-72	45-45	27-24				
0,13	77-78	52-49					
0,14	83-85	57-58	36-37				
0,15	87-87	66-64					
0,16		70-70	47-47	28-28			
0,18		78-80	60-60	32-30			
0,20		85-85	69-67	40-40	24-21	8-8	
0,22			78-74	46-48	27-27	11-12	
0,24			80-80	57-56	30-32	13-15	
0,26			83-84	61	37	14	
0,28			87-87	66-65	40	20	
0,30			88-90	70-72	44-46	22-21	
			A				

OBSERVAÇÃO:

A curva A é obtida pela projeção dos logitos de hemólise observada nos tubos contendo 0,3 ml da mistura, contra os logaritmos do complemento inicialmente presente (ver gráfico XXII).

GRÁFICO XXII



T A B E L A I.

Cálculo de $X'Y'$ e Y' quando x varia em série geométrica $q = 0,9$

		X' (Nº DO TUBO EM SEQUÊNCIA NATURAL)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
y%	Y'	X'Y'									
10	114	114	228	342	456	570	684	798	912	1026	1140
15	185	185	277	370	463	556	649	742	835	928	1021
20	238	238	317	396	475	554	633	712	791	870	949
25	282	282	353	424	495	566	637	708	779	850	921
30	321	321	385	456	527	598	669	740	811	882	953
35	355	355	426	497	568	639	710	781	852	923	994
40	388	388	459	530	601	672	743	814	885	956	1027
45	419	419	492	563	634	705	776	847	918	989	1060
50	450	450	525	596	667	738	809	880	951	1022	1093
55	481	481	556	627	698	769	840	911	982	1053	1124
60	512	512	587	658	729	800	871	942	1013	1084	1155
65	545	545	616	687	758	829	900	971	1042	1113	1184
70	579	579	650	721	792	863	934	1005	1076	1147	1218
75	618	618	689	760	831	902	973	1044	1115	1186	1257
80	662	662	733	804	875	946	1017	1088	1159	1230	1301
85	715	715	786	857	928	999	1070	1141	1212	1283	1354
90	786	786	857	928	999	1070	1141	1212	1283	1354	1425

X' é o número do tubo menos uma constante arbitrária de modo que os valores de X' são simplesmente números de uma seqüência natural.	N	<u>a</u>	<u>b</u>
	3	-82,2	2,0
	4	-80,5	2,5
	5	-161,0	3,0
$Y' = 351,9051677(1,2787536 + \log(y'/1-y))$	6	-281,75	3,5
$\underline{a} = \sum X'^2 - (\sum X')^2/N \div 16,10$	7	-450,8	4,0
$\underline{b} = \sum X'/N$	8	-676,2	4,5
	9	-966,0	5,0
N = número de observações (tubos)	10	-1328,25	5,5

NOMOGRAMA DA FUNÇÃO

SISTEMA LEPR

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

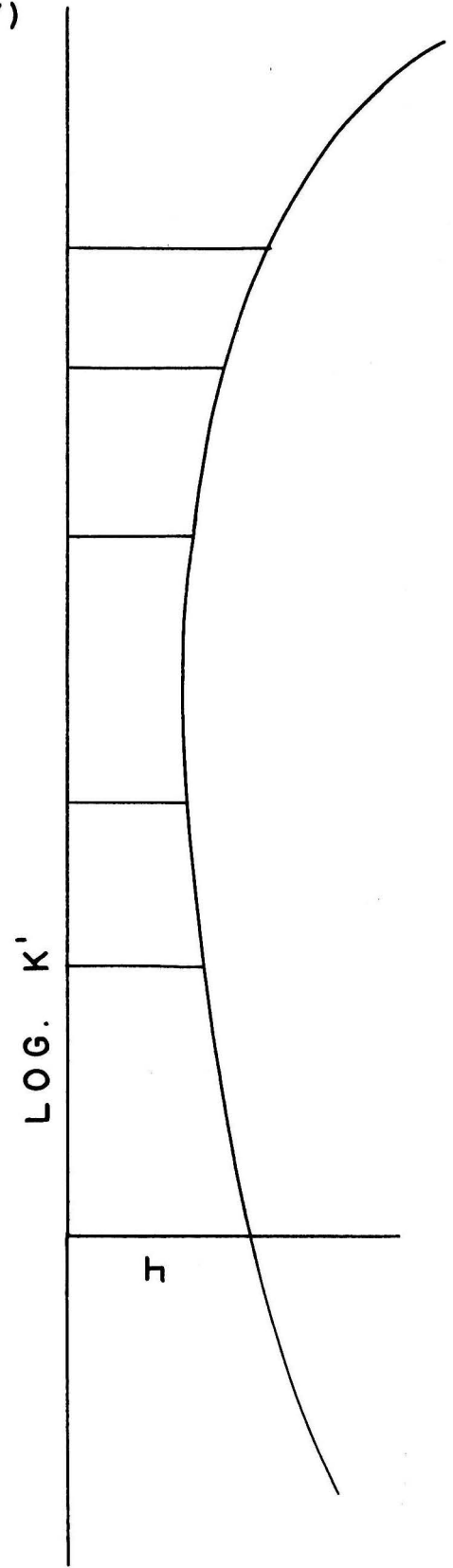
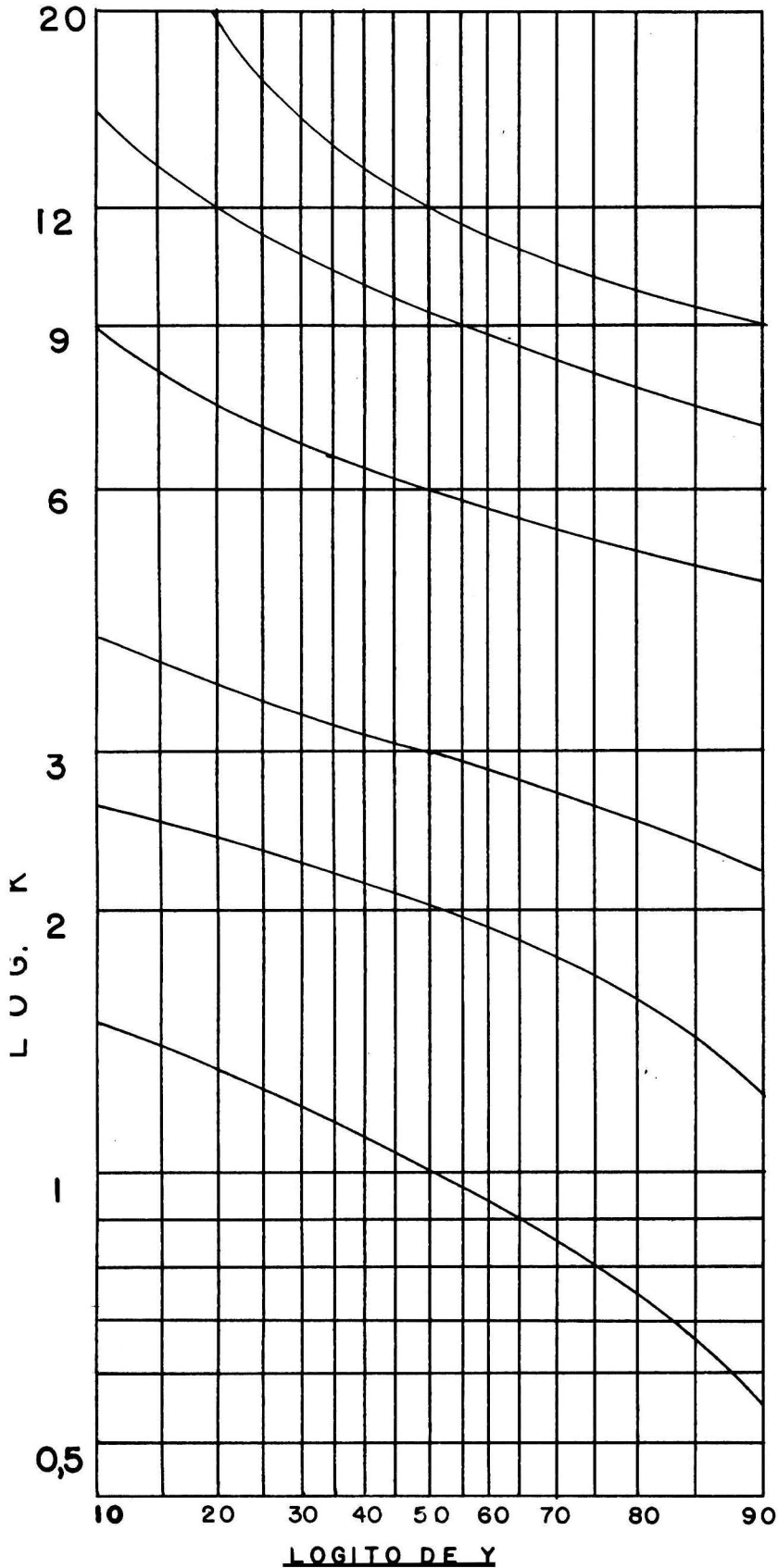


GRÁFICO XXIII

TABELA II.

Unidades de complemento (K's,A) necessárias para 50% de hemólise, indicadas pelo grau de hemólise obtido quando se empregam as seguintes quantidades de complemento:

HEMÓLISE %	CONTROLE DO SORO		REAÇÃO COM SORO E ANTÍGENO			
	1	2	3	6	9	12
10	1,42	2,66	3,95	8,9	19,0	29,0
15	1,82	2,52	3,70	7,9	18,9	21,0
20	1,26	2,42	3,61	7,4	12,1	18,0
25	1,21	2,84	3,40	7,0	11,2	15,5
30	1,15	2,24	3,80	6,7	10,5	14,8
35	1,10	2,20	3,20	6,5	10,0	18,6
40	1,07	2,14	3,14	6,8	9,8	18,0
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	11,8
65	0,88	1,88	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	10,8
80	0,78	1,68	2,56	5,1	7,3	9,9
85	0,66	1,58	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 controles do antígeno.

CAPÍTULO XII

ESTUDO COMPARATIVO DE ANTÍGENOS, MÉTODO DE ANÁLISE SEQUÊNCIAL PARA O SISTEMA LEPROSA.

O antígeno depois de preparado deve ser aferido com 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 possui, como vimos anteriormente, certas características que permitem tomá-lo como um *antígeno padrão*.

Para melhor standardização 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 testados, 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 bio-ensaios, desde que sejam estipuladas as condições necessárias para a rejeição ou a aprovação de um antígeno e sejam construídas as tabelas apropriadas 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 se 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 de 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 sequencial e que indicam o número de observações necessárias.

Um dos méritos do método de análise sequencial aplicado para comprovar uma certa condição é exigir de 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 freqüência de b é b/n . Podemos considerar que o total de n observações feitas sejam parte de um universo U de observações e então definimos a relativa freqüência das observações não defeituosas de U por ϕ que é 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 é 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 IV 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 IV 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 XXIV); 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 XXV).

Os gráficos XXIV e XXV 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 separam as zonas de rejeição, aceitação e indecisão, tendem a se aproximar uma da outra quando n cresce. O limite dessa aproximação é igual a um, porque é esse o valor mínimo possível entre n'_a e n''_a (Tabelas III e IV).

Para que um antígeno possa ser aprovado, na comparação com um antígeno padrão, o número de observações deve ser suficiente para permitir que a freqüência 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.

TESTE PARA REAÇÕES NÃO ESPECÍFICAS

Cada soro é testado com dois antígenos: um chamado A_r ou antígeno de referência ou padrão e outro A_t ou antígeno em prova. A reação é feita em presença de 6 unidades de complemento e com a dose de antígeno achada de máxima reatividade para o antígeno A_r . 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, como indicado no capítulo III. Os tubos com mais de 90% com antígeno Ar indicam soros *não reagentes*; pares de testes feitos como acima indicado, em paralelo com os antígenos Ar e At e que dão mais de 90% de hemólise com Ar são considerados *observações admissíveis*. Uma observação é considerada *defeituosa* se o grau de hemólise obtida com o antígeno At 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 III; após n observações com a defeituosas, aceitamos o antígeno At 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.

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 mostra que com êsse teste poucos antígenos evidenciam qualquer observação defeituosa nos primeiros 155 pares de observações.

Nossa experiência com soro de lepra e antígenos preparados de bacilos da tuberculose mostra, no entanto, que muitos antígenos falham ao serem submetidos a êsse teste. Assim consideramos necessária 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.

Nêsse teste, os soros humanos devem ser cuidadosamente selecionados, dada a grande prevalência de tuberculose-infecção na população. Nosso controle foi constituído de 651 soros de crianças entre 2 e 5 anos de idade, tuberculino negativas e colhidos para o controle 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 pode 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 leprosos, em forma lepromatosa, foram diluídos em soro humano não reagente, de acordo com a tabela VI. Em tubos de 12x75mm, 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 acordo com a dose indicada pela curva de isofixação); o volume é completado para 0,3 ml com salina boratada.

As reações são feitas em paralelo, usando dois antígenos, como anteriormente, Ar e At. Depois de 90 minutos de incubação a 37°C, foram juntados 0,2 ml de hemácias sensibilizadas; os tubos são incubados a 37°C por 15 minutos; 1,0 ml de salina gelada é juntado a cada tubo mostrando hemólise parcial. A leitura é feita no sobrenadante dos tubos centrifugados por 5 minutos.

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.

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 .

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

$$|G_t - G_r| \geq 0,070$$

caso contrário é considerada *não defeituosa*.

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

$$T = D (K'_{s,A} - 1)$$

A relação entre T e G no sistema lepra é

$$\log T = G + 0,568$$

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

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

$$R = 2,303 (G_t - G_r)$$

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.

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 IV 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 comparativa se 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 reações, 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.

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

O quadro XI nos mostra o comportamento de diversas partidas em testes de análise seqüencial, para antígenos solúveis em benzol e piridina.

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.

T A B E L A I I I

DECISÕES NO TESTE SEQUÊNCIAL DE PROBABILIDADE DIRETA PARA REATIVIDADE NÃO 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)	($n' a$)	($n'' a$)
0	155	-----
1	281	4
2	299	48
3	362	114
4	421	204
5	479	307
6	586	419
7	---	588

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

(De "Cardiolipin antigens" WHO, 1951).

TABELA IV

DECISÕES NO TESTE SEQUÊNCIAL 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	86	195	170
1	21	—	19	115	77	87	200	176
2	28	—	20	120	88	88	204	181
3	84	4	21	125	88	89	209	187
4	89	7	22	130	98	40	218	198
5	45	11	28	134	99	41	218	198
6	50	15	24	139	104	42	222	204
7	56	19	25	144	109	48	236	210
8	61	24	26	149	115	44	231	215
9	66	28	27	158	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 não é menor que n' a 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 "Cardiolipin antigens" W.H.O. 1951).

TABELA V

TESTE COM 6 UNIDADES DE COMPLEMENTO		
SÔRO HUMANO INATIVADO	0,05	0,05
ANTÍGENO Ar (DILUIDO)	0,10	—
ANTÍGENO At (DILUIDO)	—	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 %		

TABELA VI

Diluições do soro reagente

FATOR DE DILUIÇÃO	SORO REAGENTE	SORO NEGATIVO
1,0	---	---
1,8	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	0,28
7,5	0,04	0,26
10,0	0,04	0,86
18,0	0,04	0,48
18,0	0,04	0,68
24,0	0,04	0,92

QUADRO IX

Exemplo da avaliação de G

TUBO Nº	DILUIÇÃO	HEMÓLISE %	G (TABELA VII)
2	1,8	5%	---
3	1,8	30%	0,448
4	2,4	80%	0,425
5	3,2	100%	---

Para o cálculo tomar o valor máximo de G que é 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.

T A B E L A V I I

GRAUS DE REATIVIDADE COM SEIS UNIDADES DE COMPLEMENTO

D (FATOR DE DILUIÇÃO DO SÔRO)								
y%	1,0	1,3	1,8	2,4	3,2	4,2	5,6	7,5
10	0,880	0,444	0,585	0,710	0,885	0,958	1,078	1,215
15	0,271	0,885	0,526	0,651	0,776	0,894	1,029	1,156
20	0,288	0,852	0,498	0,618	0,748	0,861	0,986	1,118
25	0,210	0,824	0,465	0,590	0,715	0,838	0,958	1,085
30	0,188	0,802	0,448	0,568	0,698	0,811	0,936	1,068
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	0,408	0,528	0,658	0,771	0,896	1,028
50	0,181	0,245	0,386	0,511	0,636	0,754	0,879	1,006
55	0,118	0,227	0,368	0,498	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	0,708	0,828	0,955
70	0,075	0,179	0,330	0,455	0,580	0,698	0,828	0,950
75	0,055	0,169	0,310	0,435	0,560	0,678	0,808	0,930
80	0,045	0,159	0,300	0,425	0,550	0,668	0,798	0,920
85	0,028	0,137	0,278	0,408	0,528	0,646	0,771	0,898
90	0,000	0,114	0,255	0,380	0,505	0,628	0,748	0,875

OBSERVAÇÃO

O grau de reatividade é calculado como

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

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.

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)

SÔRO DE LEPRA Nº	DILUIÇÃO I:	HEMÓLISE %		REATIVIDADE		CLASSIFICAÇÃO DA OBSERVAÇÃO
		A _r	A _t	G _r	G _t	
86	1,8	80	25	0,802	0,824	<i>não defeituosa</i>
	1,8	65	75	0,885	0,810	
95	10	20	30	1,288	1,188	<i>não defeituosa</i>
	18	45	40	1,262	1,270	
807	7,5	15	20	1,156	1,118	<i>não defeituosa</i>
	10	65	70	1,080	1,075	
895	10	25	30	1,210	1,188	<i>não defeituosa</i>
	18	45	40	1,262	1,270	
188	4,2	10	15	0,958	0,894	<i>inadmissível</i>
	6,6	90	85	0,748	0,771	
808	7,5	30	35	1,068	1,047	<i>não defeituosa</i>
	10	90	80	1,000	1,045	
246	3,2	10	25	0,885	0,715	<i>defeituosa</i>
	4,2	55	90	0,786	0,628	

OBSERVAÇÃO: o sêro 188 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 sêro imprime diferente inclinação (*h*) à curva hemolítica, que a encontrada na maioria dos soros em um determinado sistema (ALMEIDA e FREITAS, 1953)

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 $\Delta K'_{S,a} / \Delta_{ant}$
	a	n		
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	reprovado	< 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 WITEBSKY, KLINGENSTEIN e KUHN (1931) de lotes de bacilos nº 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.

Em teste semelhante aplicado à antígenos de cardioliipina, a dose de antígeno é usada como se fôsse 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 cardioliipina 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 aquêlo 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.

Q U A D R O X I I

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

ANTÍGENO PRECIPITADO BRUTO		ANTÍGENOS TRATADOS PELO BUTANOL	
Nº	TÍTULO	Nº	TÍTULO
48189-A	1280	48189-Mg	3000
48189-B	780	H87-M8	2800
48189-F	1860	H87-1414	3500
48189-G	900	BCG-1	800
H87-D	1000		
H87-E	1190		
BCG-1	500		

Os antígenos não foram examinados em teste de comparabilidade de reações. 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.

REPRODUTIBILIDADE

Quando se aplica o teste de comparação em análise seqüencial 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 acumulem em um mesmo sentido. Nesse caso, poderíamos ser levados a re-provar 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.

REATIVIDADE EM SOROS NORMAIS E SOROS DE LEPRA E TUBERCULOSE

O hapteno isolado do bacilo da tuberculose (antígeno HA-5) foi experimentado com soros de pessoas *normais*. Esse grupo compreendeu indivíduos adultos não selecionados e crianças cuidadosamente controladas.

O grupo adulto *normal* compunha-se de soros *WASSERMANN* negativos, de pessoas não reconhecidamente doentes. Eram soros que vinham à exame para exame pré-nupcial e dados clínicos não puderam ser obtidos.

Os soros de crianças foram obtidos por intermédio da *National Foundation for infantile Paralysis* e compreendiam um grupo bem selecionado. As crianças, entre 2 e 5 anos de idade, tuberculino negativas, e sangradas antes de inoculadas com a vacina de *SALK*. O grupo de crianças compunha-se de 651 pacientes.

Soros de tuberculosos, obtidos através o *NEW YORK STATE DEPARTMENT OF HEALTH*, compreendiam um grupo de 177 pacientes, em diversos estádios da infecção, muitos deles com alta controlada.

Os soros de lepra lepromatosa, provieram de pacientes do *Sanatório Padre Bento e Colonia de Santo Angelo* ambos do *Departamento de Profilaxia da Lepra do Estado de São Paulo*.

Todos esses soros foram testados com o antígeno HA-5 lecitinado a 0,05% em provas de fixação do complemento quantitativa. Os resultados constam do quadro *XIII*.

Maior reatividade foi observada com soro de lepra; soros de tuberculose mostraram apenas 3% de resultados negativos.

Reações de baixos títulos foram observadas em todos os grupos, com exceção de lepra; tais resultados urgem uma investigação para o conhecimento do significado de tais títulos, obtidos mesmo em grupos onde tuberculose pode ser excluída. Um fato no entanto é evidenciado: o significado de títulos altos em diversos grupos. Realmente, se tomarmos os títulos maiores que seis, verificaremos o regular comportamento dos grupos estudados. Adultos mostraram 22% de soros com títulos maiores que 6 mas apenas 1% com títulos maiores que 12. O significado desses títulos não pode ser conhecido, por falta de informações clínicas. Estudos estão em progresso entre universitários, com exame clínico e testes para tuberculose feitos sob a direção do professor *Dr. RAFAEL DE PAULA SOUZA da Faculdade de Higiene e Saúde Pública*. Dessa forma, o quadro *XIII* nos dá apenas um esquema do comportamento do antígeno por nós estudado, sem pretender conhecer o exato significado de tais achados. No entanto os resultados obtidos com soro de lepra, indicam a reatividade maior observada nesses grupos de soros experimentados.

Q U A D R O X I I I

REATIVIDADE DO ANTÍGENO HA-5, LECITINADO A 0,05%,
EM DIVERSOS GRUPOS DE PACIENTES.

T Í T U L O S	G R U P O S			
	CRIANÇAS NORMAIS(*)	ADULTOS NORMAIS	TUBERCULÓSOS	LEPROSOS
<3,0	78%	46,4%	3%	0%
3,1 - 6,0	21,4%	31,4%	28%	0%
6,1 - 12,0	0,6%	21,2%	30%	0%
12,1 - 20,0	0%	1%	12%	0%
>20,0	0%	0%	27%	100%
TOTAL	651	597	177	112

(*) Tuberculino-negativas

TESTE SEQÜÊNCIAL DE PROBABILIDADE DIRETA
PARA UM ÊRRO $\hat{=} 2\%$ NA DECISÃO TOMADA

$P' = 0,75$

$P'' = 0,85$

06

α = NÚMERO DE OBSERVAÇÕES DEFEITUOSAS

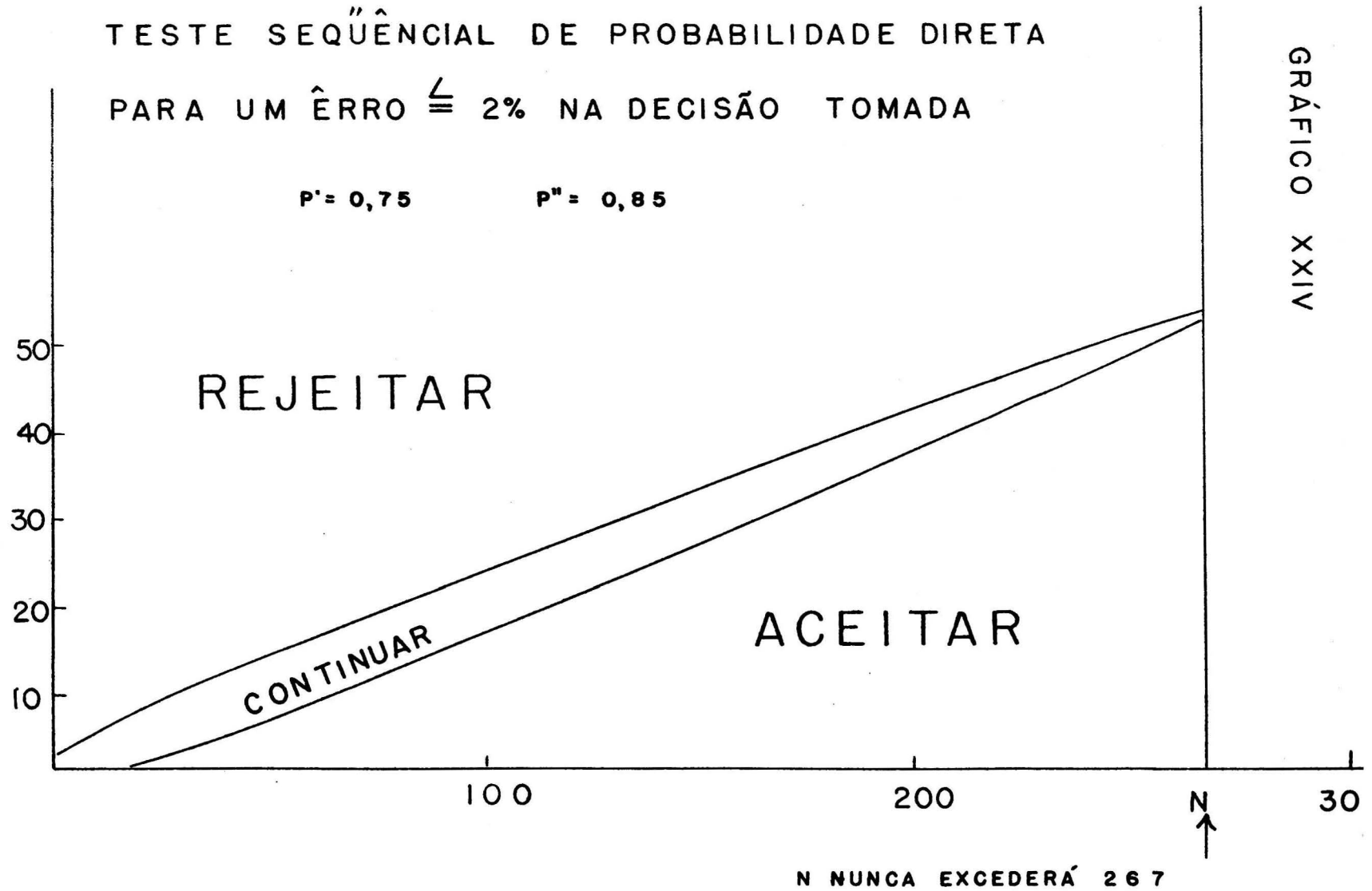


GRÁFICO XXIV

N = NÚMERO TOTAL DE OBSERVAÇÕES

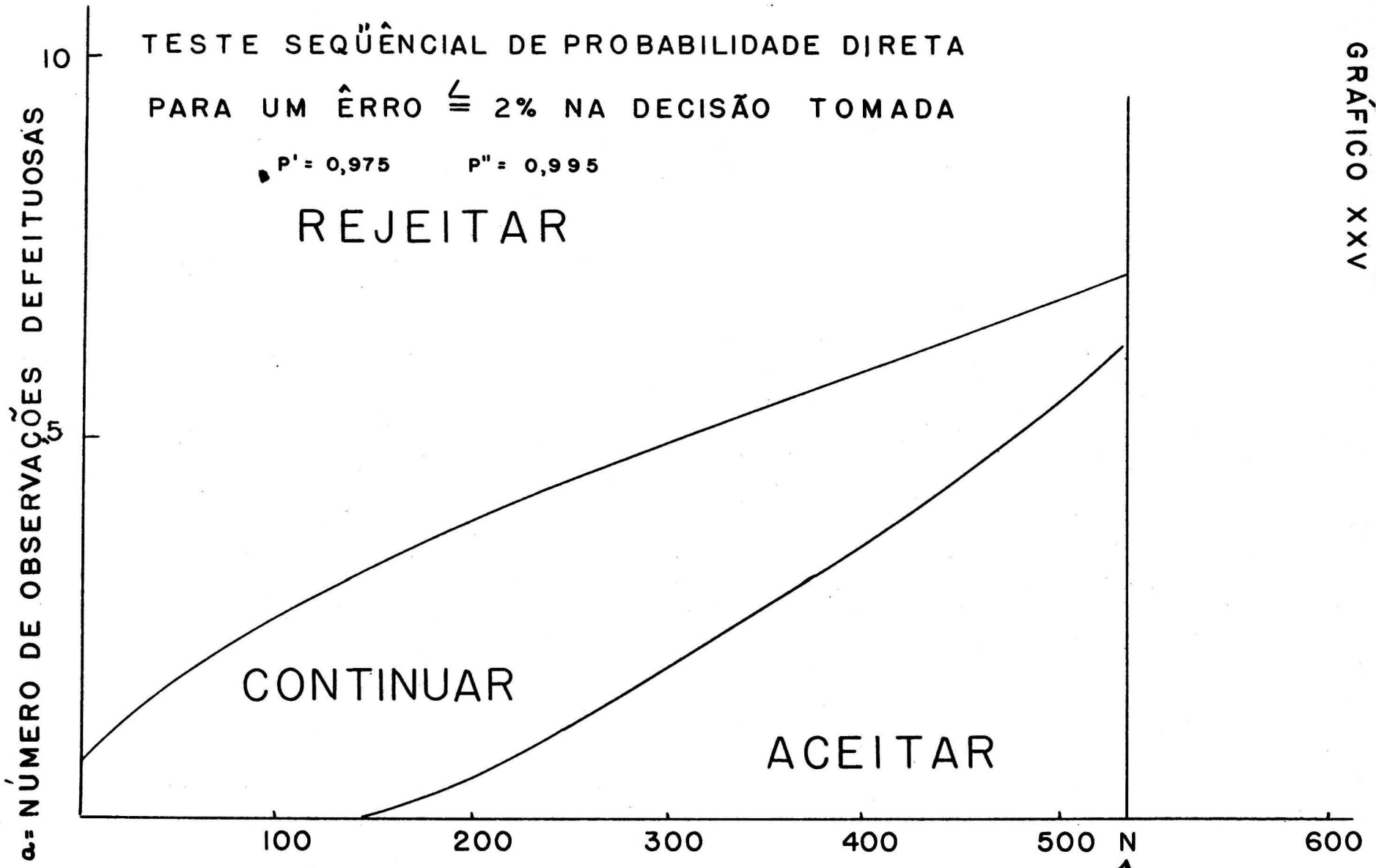
TESTE SEQÜÊNCIAL DE PROBABILIDADE DIRETA
PARA UM ÊRRO $\leq 2\%$ NA DECISÃO TOMADA

$P' = 0,975$ $P'' = 0,995$

REJEITAR

CONTINUAR

ACEITAR



C_t
NÚMERO DE OBSERVAÇÕES DEFEITUOSAS

N NUNCA EXCEDERÁ 536
N = NÚMERO TOTAL DE OBSERVAÇÕES

RESUMO GERAL E CONCLUSÕES

1° - A reação de fixação do complemento em sêro de lepra com antígenos preparados de bacilos da tuberculose se deve à atividade haptênica dos fosfatídeos ácidos complexos ligados à carboidratos e solúveis em piridina.

2° - O efeito anticomplementar dos antígenos solúveis em piridina é corrigido pela lecitina; efeito semelhante se observa nos antígenos aquosos do bacilo da tuberculose.

3° - As reações entre antígeno, anticorpo e complemento, podem ser melhor estudadas por meio das "curvas de isofixação" obtidas por projeção de antígeno contra sêro, o complemento sendo mantido constante.

4° - 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 sêro presente na reação sobre os parâmetros da linha de regressão: (antígeno-complemento).

5° - O ramo horizontal da curva de isofixação indica as condições nas quais se deve processar a titulação do sêro. A influência da dose de antígeno empregada sobre os parâmetros da linha de regressão sêro-complemento pode ser apreciada e dada uma correta interpretação.

6° - A dose de antígeno a ser usada numa titulação de sêro é aquela que não afeta o relativo paralelismo das curvas de isofixação. Então, complemento fixado será função linear da quantidade de sêro presente.

7° - A parte da curva de isofixação que liga os dois ramos assintóticos, traduz a suplência observada entre sêro e antígeno e indica as condições em que a fixação do complemento depende tanto da quantidade de sêro presente, como da quantidade de antígeno usado. Nesse caso a titulação de qualquer um desses elementos não poderá ser feita.

8° - 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.

9° - 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.

10° - 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.

11° - O estudo da reação entre sêro de lepra e antígenos solúveis em piridina sugere a aplicação da reação de fixação do complemento quantitativa para controle sorológico da leprose, não só como meio diagnóstico auxiliar, como também para avaliar sorologicamente o efeito das drogas modernamente utilizadas para seu tratamento.

R E F E R Ê N C I A S

- 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., 1956, Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement-fixation tests. *J. Immunol.*, 76: 259-263.
- ALMEIDA, J.O.; CARVALHO, R.P.S. & PADRON, C., 1956, Complement-fixing antibodies in the sera of 534 lepomatous 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 Chaga's disease in blood banks. *Am. J. Trop. Med.*, 3: 490-494.
- ALMEIDA, J.O. & THOMPSON, W.R., 1955, Incidence of defective observations in replicate complement fixation tests. *Dados não publicados; cópias sob requisição aos autores.*
- ALMEIDA, J.O., MALTANER, F., SILVERSTEIN, A.M. & THOMPSON, W.R., 1955, Chapter 3, segunda edição de "Cardiolipin antigens" publicado pela Organização Mundial de Saúde. *Geneva.* 52 pgs.
- ANDERSON, R.J., 1927, A study of the phosphatide fraction of tubercle bacilli, *J. Biol. Chem.*, 74: 537-551.
- AOKI, Y & MURAO, K., 1933, Zur Brauchbarkeit der Witebskychen Prinzips der Tuberkulose-Komplementbindungsreaktion für die Lepra, *Ztschr. Immunitätsforsch.*, 79: 365-371.
- ASSUMPTÃO, 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'extract étheré de lépromes gardés depuis des années dans l'alcool comme antigène lepreux, *Compt. rend. Soc. biol., Paris*, 67: 817-819.
- BAYARRI, S.V. & AHUIR, M.R., 1947, Diagnostico sorologico del kalazar, com el antigeno metilico tuberculoso, *Rev. clin. españ.*, 25: 103-107.
- BESREDKA, H. & JUPILLE, F., 1914, De la valeur de la réaction 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., 1955, Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene. 7a. edição. *Cia. Melhoramentos. São Paulo*, 835 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 clin. et biol.*, 7: 9-11.
- Über die Serologie der Lepra. II. Komplementbindung bei Lepra mit dem Tuberkulose-Antigen von Witebsky, Klingenstein und Kuhn. *Arch. f. Schiffs. u. Tropen.*, 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), *Folia clin. et biol.*, 8: 72-75.
- 1937, Über die Serologie der Lepra. VI. Anwendung der Witebskyschen Methode zur Herstellung eines Antigens für Komplementbindung bei Lepra mit "Streptothrix leproides", *Arch. f. Schiffs. u. Tropen. Hyg.*, 41: 565-567.
- BIER, O.G., SIQUEIRA, M. & FURLANETTO, R.S., 1955, Quantitative complement

- 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 leproide* (Devcke), *Folia clin. et biol.*, 8:72-75.
- 1937, Über die Serologie der Lepra, VI. Anwendung der Witebskyschen Methode zur Herstellung eines Antigens für Komplementbindung bei Lepra mit "*Streptothrix leproides*", *Arch. f. Schiff. 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 und Kuhn bei Lepra, *Dermat. Wchnschr.*, 47: 1688-1691.
- BROOKS, S.C., 1920, Precise titration of complement, *J.M. Research*, 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 réaction de déviation de l'alexine (BORDET-GENGOU) avec les antigènes et les anticorps tuberculeux, *Compt. rend. Soc. biol. Paris*, 67: 528-530.
- CHARGAFF, E. & SCHAEFER, W., 1935, Analyse serologique des différentes 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.M. 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 kalazar, *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, Ueber den Nachweis von Antikörpern im Serum eines Leprakranken mittels Komplementableitung, *Wien. klin. Wchnschr.*, 19: 1555.
- EITNER, E., 1908, Zur Frage der Anwendung der Komplementbindungsreaktion auf Lepra, *Wien. klin. Wchnschr.*, 21: 729.
- EICHBAUM, F.M., 1942, Fixação do complemento com o antígeno de Witebsky-Kuhn-Klingenstein em dermatoses tropicais: lepra, leishmaniose, pênfigo foliáceo e blastomicose, *Rev. brasil. biol.*, 2: 285-300.
- EICHBAUM, F.M., 1943, Reactivity of leprosy sera with lecithin. I. Incidence of the lecithin reaction in Wassermann positive and negative

- FREUND, J., 1927, Alcohol soluble specific substances of *B. diptheriae* and of *Streptothrix*, *J. Immunol.*, 13:161-169.]
- FRUGONI, C. & PISANI, S., 1909, Vielfache Bindungseigenschaften des Komplementes einiger Sera (Leprakranker) und ihre Bedeckung, *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, Occurrence 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, Desvio do complemento na lepra com o *Streptothrix leproide* de Deycke desengordurado. Sensibilização dos pacientes a esta reação pela administração de iodeto de potássio, *Rev. Biol. & Hyg.*, 2:165-174.]
- GOMES, J.M. & PATTEO, J.D., 1928, Desvio do complemento na lepra. *Rev. Biol. & Hyg.*, 1:189-104.]
- 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 (WKK) antigen, a new technique, *Indian J. M. Res.*, 26:843-849.]
- 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. & Clin. Med.*, 27:97-102.]
- HAZEN, E.L. & GREENSPAN, A., 1936, A study of non specific reactions of cerebrospinal fluids with the Bordet and Ruelens antigen in the complement fixation test for syphilis, *J. Lab. & Clin. Med.*, 21:1185-1190.]
- ICHIATA, T., 1940, Praktische bewrtung userer serumreaktion der lepra als fruhdiagnose, *La lepro 11*, suppl. 85-86 (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. pd.*]
- KORNEL, G., 1933, Vergleichende Komplementbindungsversuche mit serum von Leprosen, tuberkulosen und 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, 38:219-232.]
- LOWE, J., 1942, A note on complement-fixation test in leprosy and calazar with Witebsky-Klingenstein and Kuhn (WKK) 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 (WKK) antigen, *Indian J. M. Res.*, 26:833-841.]
- MACHEBOEUF, M. & BONNEFOI, A., 1935, Études sur les antigènes fixateurs des bacilles Tuberculeux. Essais de fractionnement et de purification de la fraction lipoidique active comme haptène, (extraite de bacilles tués par la chaleur, *Bull. Soc. chim. biol.*, 17:1201-1209.]
- MACHEBOEUF, M. & FAURE, M., 1939, Sur l'existence, dans les bacilles tuberculeux, d'acides phosphatidiques complexes constitués par de l'acide glycérophosphorique lié par l'esterification, d'une part à des acides gras, et d'autre part à des poly-alcools non azotés, *Compt. red. Acad. sc.* 209:700-702.]
- MACHEBOEUF, M. & LEVY, G., 1935, Études sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux. Antigènes fixateurs contenues dans les substances lipoidiques extraites de bacilles tués par la chaleur, *Bull. Soc. chim. biol.*, 17:1194-1200.]
- MACHEBOEUF, M., LEVY, G., & FAURE, M., 1935, Études sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux. Purification de l'haptène lipoidique de bacilles tués par la chaleur, separation d'avec les phosphatides, elimination des impuretés azotées. Étude de quelques uns des caractères physicochimiques de la fraction active, *Bull. Soc. chim. biol.*, 17:1210-1234.]
- MACHEBOEUF, M., LEVY, G. & FAURE, M., 1937, Recherches sur la nature chimique de l'haptène fixateur lipoidique des bacilles tuberculeux. Étude chimique de la fraction active purifiée, *Compt. rend. Acad. sc.*, 204:1843-1845.]
- MACHEBOEUF, M., LEVY, G., FETHKÉ, N., DIERYCK, J. & BONNEFOI, A., 1934, Études chimiques sur le bacille tuberculeux. Premier memoire. Essais 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 6 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. & Clin. Med.*, 33:383-391.]

- MALTANER, E. & MALTANER, F., 1945, The standardization of the cardioli-
lecithin-cholesterol antigen in the complement fixation test for sy-
philis, *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., 1948a, Application of direct probability se-
quential analysis to acceptance or rejection of antigens for comple-
ment fixation tests for syphilis (*Research Report, 11 May*). Dados não
publicados. Cópias sob requisição aos autores ou à Organização Mun-
dial de Saúde.
- MALTANER, F. & THOMPSON, W.R., 1948b, Direct probability sequential analy-
sis. Application to testing serologic reagents, *Annual Report of the
Div. Lab. and Res., N.Y. State Dep. of Health, Albany, N.Y.*, pgs. 32-33.
- MARCONDES, J.R., 1929, A reação de Gomes para o diagnóstico precoce da le-
pra e seu valor prophylactico. *Tese da Faculdade de Medicina de São
Paulo*, 50 pgs.
- 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. Exp. 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.*, 59:477-491.
- MUCH, H., 1913, Neve immunobiologische und klinische Tuberculosestudien
mit Berücksichtigung der Lepra, *Arch. Dermat. u. Syph.*, 1115:368.
- MUCH, H., 1915, Serological and experimental studies on leprosy, *Lepra*,
Bibliot. Intern. Paris, XV:85-88.
- ORNSTEIN, F., 1926, Ueber das antigene Vermögen der Lipoide, *Wien. klin.
Wchnschr.*, 39:785.
- PADRON, C., 1952, A study of certain antigens of tubercle bacilli, *Comuni-
cação 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 an-
tigens of the tubercle bacillus, *Ibid: 9. 1953*, Water soluble antigens
of the tubercle bacillus, *Ibid: 13-15. 1955*, Antigens of the tubercle ba-
cillus, *Ibid: 18. 1956*, Antigens of the tubercle bacillus, *Ibid: 11-12.*
1956, Chemical fractions of the tubercle bacillus in relation to sero-
logic studies, *Tuberculosis*, 16:134-137.
- PANGBORN, M.C. & ALMEIDA, J.O., 1955, Antigenic fractions from tubercle ba-
cillus. Apresentado em seminário da Div. Labs. Res., N.Y. State Dep.
Health., em 16 de fevereiro de 1955.
- PANGBORN, M.C., ALMEIDA, J.O., MALTANER, F., SILVERSTEIN, A.M. & THOMPSON, W.R.,
1955, Cardioli-
pin antigens. World Health Organization, Palais des Na-
tions. Geneve. 52 pgs.
- PANGBORN, M.C., MALTANER, F., TOMPKINS, V.N., BEECHER, T., THOMPSON, W.R. & FLYN,
M.R., 1951, Cardioli-
pin antigens. Publicação da Organização Mundial de
Saúde, 63 páginas. Geneve.
- PEREIRA, P.C.R., 1936, La réaction de fixation du complement avec l'anti-
gène de Witebsky, Klingenstein et Kuhn dans la lepre, *Internat. J. Le-
prosy*, 4:207-214.

- PEFEIRA, 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., 1932, Immunisierungsversuche mit Lecithin aus Menschenhirn, *Ztschr. Immunitätsforsch.*, 73:385-391.]
- RABELLO FILHO, E., MACHADO, J. C. & PINTO, J. T., 1938, Serologisches Studien bei Nervenlepra mit der Witebsky-Klingenstein-Kuhn reaktion. *Dermat. Wchnschr.*, 107:1214.]
- RABELO FILHO, E. & PINTO, J. T., 1938, Interêt de la séro-réaction de Witebsky, Klingenstein et Kuhn pour la connaissance des formes de la lèpre, *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 pathogenesis and treatment of the disease. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, London, 32:497-504.]
- SACHS, H. & KLOPSTOCK, A., 1925, Die serologische Differenzierung von Lecithin und Cholesterin, *Biochem. Ztschr.*, 159:491-501.]
- SCHAEFER, W., 1940, Sur la séparation des anticorps lipoidiques polysaccharidiques et proteidiques des sérums tuberculeux au moyen de la réaction de l'inhibition spécifique, *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 (WKK) or similar antigens: a modified technique, *Indian M. Gaz.*, 80:396-398.]
- SEN GUPTA, P. C., 1948, Research on calazar 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 autores, publicado em 1909.]
- STATINÉANU, A. & DAMELOPOLU, D., 1909, Fixation de l'alexine essayée avec le serum et le liquide cephalo-rachidien des lepreux, en présence de la lecithine comme antigène, *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 Araujo e Cia.]
- STENFFENHAGEN, K., 1910, Ueber Komplementbindungsreaktion bei Lepra, *Berl. klin. Wchnschr.*, 47:1362.]
- TAYLOR, J. & MALONE, R. H., 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*:27-28.]
- 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 não publicados.* Cópias sob requisição à Organização Mundial de Saúde ou aos autores.]
- ULRICH, C.A. & MAC ARTHUR, F.X., 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. pages 261-454.]
- WADSWORTH, A.B., MALTANER, F. & MALTANER, E., 1925, A study of the complement fixation reaction in tuberculosis, *J. Immunol.*, 10:241-431.]
- 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 Antigenen Eigenschaften von Cholesterin, Cholesterinderivaten und synthetischem Lecithin, *Klin. Wchnschr.*, 10:1941-1944.]
- WILLIS, F.F., 1912, The relationship of acid-fast bacilli, *Centralbl. f. Bakt., I. Q.*, 61:67-58.]
- WITEBSKY, E., KLINGENSTEIN, R. & KUHN, H., 1931, Serodiagnostische Untersuchungen bei Tuberkulose, *Klin. Wchnschr.*, 10:1068-1071.]

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
IV	13 ^a a contar de baixo	salina	solução salina
V	8 ^a a contar de baixo	com 57%	em 57%
VI	18 ^a	confirmavam	confirmaram
VI	23 ^a a contar de baixo	o reação	a reação
VII	4 ^a	no	na
VIII	3 ^a a contar de baixo	chaulmógrico	chaulmúgrico
X	6 ^a	na atividade	para a atividade
XI	16 ^a	ano que	ano em que
XI	20 ^a a contar de baixo	à espécie	a espécie
XI	26 ^a a contar de baixo	com tuberculose	contra tuberculose
1	9 ^a a contar de baixo	negligível	negligenciável
4	1 ^a	As se fazer	Ao se fazer
5	5 ^a	STANDARD METHODS(1947)	WADSWORTH(1947)
8	17 ^a	poude	pôde
10	22 ^a a contar de baixo	salina	solução salina
11	11 ^a a contar de baixo	análises	análise
12	8 ^a a contar de baixo	salina	solução salina
13	6 ^a	salina	solução salina
13	17 ^a	(STANDARD METHODS, 1947)	(WADSWORTH, 1947)
13	17 ^a	salina	solução salina
13	22 ^a	existe	existem
13	27 ^a	suplementar Ca++	suplementar com Ca++
13	9 ^a a contar de baixo	salina	solução salina

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
13	4 ^a a contar de baixo	salina	solução salina
13	1 ^a a contar de baixo	salina	solução salina
32	5 ^a	ponto a_x	ponto O
34	1 ^a depois do Quadro II	determina uma	determina pontos sobre uma
36	8 ^a a contar de baixo	afetam o valor	afetam sensivelmente o valor
77	9 ^a a contar de baixo	exigir de um	exigir um
88	8 ^a a contar de baixo	poude	pôde
92	3 ^a	ligados à	ligados a
92	18 ^a	poude	pôde