

ANTÍGENO METÍLICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO. EXTRAÇÃO A TEMPERATURA AMBIENTE (Nota prévia) *

Ettore RUGAI **
Mirthes UEDA ***
Paulo Mutuko NAKAMURA ***
Manoel de BRITTO e SILVA ***

RIALA6/468

RUGAI, E.; UEDA, M.; NAKAMURA, P.M. & BRITTO e SILVA, M. — Antígeno metílico de *Trypanosoma cruzi* para fixação de complemento. Extração a temperatura ambiente. (Nota prévia). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(1):1-3, 1979.

DESCRITORES: *Trypanosoma cruzi*; antígenos; doença de Chagas; tripanossomíase americana, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Diversos antígenos, diferenciáveis pelo modo de preparação, já foram utilizados para o imunodiagnóstico da infecção chagásica, através da reação de fixação de complemento.

GUERREIRO & MACHADO⁷, em 1913, prepararam o primeiro antígeno, a partir de órgãos de cães infectados com *Trypanosoma cruzi*. Diversos autores, após esta data, obtiveram preparações antigênicas, utilizando técnicas que se diferiam em pequenos detalhes.

Mais tarde, começou-se a empregar culturas *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* para extração de antígenos. ROMAÑA & DIAS¹⁰, em 1942, utilizaram processo de purificação em acetona, com posterior extração com álcool etílico absoluto. Em 1943, DAVIS⁵ utilizou suspensão salina de tripanossomo, obtido em culturas *in vitro*, promovendo extração antigênica através de congelamento e descongelamento. MUNIZ & FREITAS⁹, em 1944, modificaram a técnica empregada por Davis, a fim de simplificar o método de preparação, obtendo bons resultados.

FREITAS & ALMEIDA⁸, em 1949, para executar a reação de fixação de complemento

CH₅₀%, no diagnóstico da doença de Chagas, prepararam um antígeno a partir de culturas de tripanossomos empregando extração benzeno-cloroformada.

CHAFFEE *et alii*⁴, por outro lado, em 1956, obtiveram um preparado em que utilizavam processo de purificação em éter etílico anidro. BATISTA & SANTOS², em 1959, utilizaram antígeno empregando metanol na extração da fração antigênica. BARACCHINI *et alii*², em 1966, após a purificação dos tripanossomos em acetona, efetuaram a extração do antígeno com metanol, a temperatura de 120°C.

No presente relato, os autores descrevem a técnica de preparação do antígeno metílico, no qual todas as etapas são efetuadas a temperatura ambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os tripanossomos foram cultivados em meio de cultura, segundo RUGAI & RUGAI¹¹ e RUGAI & SOUZA¹². As culturas foram incubadas a 26-28°C, durante 10 a 15 dias. O meio líquido

* Trabalho em andamento na Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Biologista aposentado do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto Adolfo Lutz.

foi então filtrado em camada de gaze e em camada de algodão e centrifugado a 2.000 rpm, durante 20 a 30 minutos, e o sedimento foi lavado por três vezes com solução salina estéril.

Ao sedimento obtido adicionou-se acetona p.a., na proporção de 10 ml deste solvente para cada ml de sedimento de tripanossomo. Após a centrifugação, adicionou-se o mesmo volume de acetona, efetuando-se esta operação por mais duas vezes. Para evaporação da acetona a fim de obter o pó seco de tripanossomo, após a última decantação do líquido, levou-se o frasco à centrífuga por mais 15 a 20 minutos, a 3.000 rpm, ou então colocou-se o frasco num cristalizador a vácuo. O pó seco foi então pesado e transferido para uma coluna de vidro de 20 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro, em cuja extremidade inferior existem dois estrangulamentos e um colo estreito; entre os dois estranguladores introduziu-se um chumaço de algodão e, na extremidade inferior, um pedaço de tubo de borracha e uma pinça de Bünsen ou de Castaloy para regular o fluxo de líquido.

Adicionou-se, então, acetona p.a. sobre o pó contido na coluna (na proporção de 0,1 g de pó/30 ml de acetona) e deixou-se escoar o solvente, de modo que o fluxo de escoamento fosse de 1 gota/10 seg, completando-se a remoção da acetona por meio de bomba a vácuo.

Ao pó seco de tripanossomo, adicionou-se álcool metílico p.a. desidratado*, na proporção de 0,1 de pó/30 ml de metanol.

O álcool metílico foi deixado em contato com o pó de tripanossomo no mínimo por uma hora; foi então efetuada a "percolação", deixando escoar o eluato lentamente, de maneira que o fluxo de escoamento fosse de 1 gota/10 seg.

O extrato límpido obtido consistiu em antígeno metílico de *Trypanosoma cruzi*, para a reação de fixação de complemento.

Para determinar o título ou a dose ótima deste antígeno, para as reações de fixação de complemento de rotina, foi realizada a dosagem em bloco (cruzada) contra um soro reagente conhecido com título 1:32. A técnica foi a de Kolmer, modificada¹, na qual se empregaram 2 unidades de complemento, 5 unidades de hemolisina anticarneiro e hemácias de carneiro a 2%. A incubação da reação foi feita em banho-maria a 37°C, durante 90 minutos. Após o acréscimo do sistema indicador, seguiu-se nova incubação em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos, após o que foi efetuada a leitura.

Nos diferentes lotes de antígenos preparados a partir dos dois meios de cultura acima referidos, a dose ótima ou títulos obtidos nestas titulações foi em média de 1:80.

Este reagente, assim obtido, demonstrou ser desprovido da atividade anticomplementar em 5 diferentes lotes preparados. Mostrou ser, ainda, antígeno bastante específico, não apresentando reações cruzadas, quando foi testado com soros reagentes para sífilis, toxoplasmose e mononucleose infecciosa. Evidenciou, ainda, ser de boa reprodutibilidade, uma vez que, em todos os lotes preparados, a dose ótima a ser empregada foi sempre ao redor do mesmo título.

Pelos testes efetuados em diferentes temperaturas, este antígeno apresentou ótima estabilidade. Quando mantido em estufa a 37°C, e observado até 2 meses, não demonstrou qualquer alteração no seu título. Mantido a temperatura ambiente, o título do antígeno não variou mesmo após um ano. Conservado a 4°C, em geladeira, não demonstrou alteração no seu título, mesmo após dois anos de observação.

Experimentos mais detalhados sobre este antígeno estão em andamento em nosso laboratório.

RIALA6/468

RUGAI, E.; UEDA, M.; NAKAMURA, P.M. & BRITTO e SILVA, M. — Methylc antigen of *Trypanosoma cruzi* for complement fixation test. Extraction at room temperature. (Previous note). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(1): 1-3, 1979.

DESCRIPTORS: *Trypanosoma cruzi*; antigens; Chagas'disease; trypanosomiasis, South American, diagnosis.

* A desidratação do álcool metílico foi feita previamente, acrescentando-se a este reagente sulfato de sódio p.a., na proporção de 10%, para eliminar uma eventual umidade excessiva.

RUGAI, E.; UEDA, M.; NAKAMURA, P.M. & BRITTO e SILVA, M. — Antígeno metílico de *Trypanosoma cruzi* para fixação de complemento. Extração a temperatura ambiente. (Nota prévia). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(1): 1-3, 1979.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARACCHINI, O. & BRITTO e SILVA, M. — Emprêgo da técnica de Kolmer, modificada, na fixação de complemento, usando antígeno metílico de *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico da doença de Chagas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30: 73-9, 1969/70.
2. BARACCHINI, O.; COSTA, A. & CARLONI, J. — Emprêgo do calor à temperatura de 120°C e do metanol no preparo de antígeno de *Trypanosoma cruzi*. *Hospital*, 70:81-4, 1966.
3. BATISTA, S.M. & SANTOS, U.M. — Antígeno metílico de cultura de *Schizotrypanum cruzi*. *Hospital*, 56:1045-51, 1959.
4. CHAFFEE, E.F.; FIFE, E.H. & KENT, J.F. — Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement fixation. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 5:763-71, 1956.
5. DAVIS, D.J. — An improved antigen for complement fixation in American trypanosomiasis. *Publ. Hlth. Rep.*, 58:775-7, 1943.
6. FREITAS, J.L.P. & ALMEIDA, J.O. — Nova técnica de fixação de complemento para moléstia de Chagas. (Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*). *Hospital*, 35:787-800, 1949.
7. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. (Nota preliminar). *Bras. Méd.*, 27:225-6, 1931.
8. MOURÃO, O.G. & MELLO, O.C. — Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 9:183-9, 1975.
9. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação de complemento. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*, 41:303-33, 1944.
10. ROMANA, C. & DIAS, E. — Reação de fixação de complemento na Doença de Chagas, com antígeno alcóolico de cultura de *Schizotrypanum cruzi*. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*, 37:1-10, 1942.
11. RUGAI, E. & RUGAI, R.T. — Meio de cultura para *Trypanosoma cruzi* esterilizável pelo calor. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 25/27:61-3, 1965/67.
12. RUGAI, E. & SOUZA, A.M. — Método de cultura de *Trypanosoma cruzi* em larga escala por arejamento (borbulhamento de ar). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30: 61-3, 1969/70.

Recebido para publicação em 18 de janeiro de 1979.

