

UNA VARIANTE EN LA TECNICA DE LA REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Por JOSÉ RUIZ (Cátedra de Química Biológica)
y MIGUEL I. RIBA (Cátedra de Microbiología)

—1960—

INTRODUCCION

Con la creación de nuevas técnicas para el cultivo "in vitro" del *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, las reacciones serológicas de fijación del complemento que tienen su origen en los históricos trabajos de César Guerreiro y Astrogildo Machado en 1913 ⁽¹⁾, adquieren desde hace algunos años un papel fundamental en el diagnóstico de la infección chagásica en sus formas crónicas.

Los progresos obtenidos en la preparación de antígenos de mayor especificidad y poder fijador empalidecen las objeciones que se hacían a los métodos indirectos para el diagnóstico de esta enfermedad. La abundante bibliografía de que se dispone en la actualidad informa sobre la intensidad de la investigación con que numerosos científicos se abocaron a la tarea de mejorar constantemente los antígenos habiéndose llegado a métodos que permiten obtenerlos con un margen de seguridad compatible con las necesidades de la clínica médica. En este sentido deben destacarse los trabajos de Kelser ⁽³⁾, Davis ⁽⁴⁾, Muñoz y Freitas ⁽⁵⁾, Romana y Díaz ⁽⁶⁾. En nuestro país, la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina ⁽⁷⁾, la Dirección de Lucha Contra la Enfermedad de Chagas ⁽⁸⁾, el Instituto de Medicina Regional de Tucumán ⁽⁹⁻¹⁰⁾.

También se han descrito numerosas técnicas para la realización de esta reacción habiéndose adoptado en nuestro medio la que sigue la Dirección de Lucha Contra la Enfermedad de Chagas, que ha tenido notable divulgación (8). En su realización anotamos con cierta frecuencia falta de uniformidad en los resultados interpretando que ello se debía posiblemente a la inexactitud con que se preparaba la dilución óptima del suero hemolítico de acuerdo al título obtenido en su determinación, error que no es infrecuente debido a la imprecisión del material volumétrico con que cuentan en muchos casos los ambientes sanitarios.

Con la variante que presentamos en este trabajo, creemos haber eliminado en gran parte el inconveniente apuntado, ya que en nuestras experiencias obtuvimos halagadores resultados. Consiste, en síntesis, en preparar simultáneamente con las series de dilución de hemolisina para conocer la concentración óptima, series correlativas de diluciones de suero hemolítico a emplear en la reacción de fijación del complemento.

ELEMENTOS NECESARIOS

Materiales: gradillas y tubos de ensayo y de hemólisis, pipetas de 10, 2, y 1 ml. graduadas al 1/100, matraces o probetas controladas, baño térmico, centrífuga, etc.

Solución fisiológica: sol, salina isotónica de Na Cl al 8,5 por mil en agua destilada. Conviene que sea de reciente preparación.

Hemáticos de carnero al 2 %: frescos y lavados con sol. fisiológica hasta eliminación de toda traza de hemólisis. Se suspenden en sol. fisiológica midiendo dos volúmenes de glóbulos centrifugados y completando a 100.

Suero del enfermo: se prefiere suero límpido sin trazas de hemólisis. Antes de la reacción se inactiva a 56°C. durante 30 minutos. Si el suero se conserva debe inactivarse nuevamente antes de cada reacción.

Suero hemolítico: suero anti-carnero. Se emplean las ampollas procedentes de laboratorios responsables o se prepara sensibilizan-

do a conejos con hematíes de carnero. En este caso adoptamos la técnica aconsejable por la M.E.P.R.A. (2).

El suero hemolítico debe inactivarse a 56°C. 30 minutos (conjuntamente con los sueros humanos antes de la reacción).

Complemento: se prefiere una mezcla de sueros frescos de 3 o 4 cobayos que han sido mantenidos en ayunas desde 12 hs. antes de la extracción.

En esta técnica se emplea directamente el complemento diluido 1/20 en sol. fisiológica.

Antígeno: empleamos los antígenos chagásicos preparados a partir de cultivos de *Schizotrypanum cruzi* y elaborados por laboratorios de reconocida responsabilidad.

Todo antígeno debe ser controlado por lo menos una vez al mes titulando su poder fijador y controlando su inespecificidad o poder anticomplementario y poder hemolítico. Adoptamos la técnica preconizada por Cerisola y Rosenbam (8).

Momentos antes de la reacción se diluye con sol. fisiológica según título.

TECNICA DE LA REACCION

Síntesis: consiste en las siguientes etapas.

Etapa 1ª — Preparación de dos series de diluciones conocidas del suero hemolítico en cantidades suficientes para emplearlas posteriormente en la reacción final. Se realizan en tubos de ensayo de tamaño conveniente según el número de sueros a analizar.

Preparación simultánea de dos series correlativas en tubos de hemólisis que contendrán: dilución de suero hemolítico + hematíes de carnero + complemento. Estas dos series constituyen el "sistema hemolítico de titulación".

Etapa 2ª — Preparación de la reacción propiamente dicha con los sueros, problemas y testigos, en tubos de hemólisis, que contendrán: suero del enfermo (o testigo) + antígeno + complemento.

Etapa 3ª — Incubación del suero frente al antígeno y simultáneamente incubación y lectura del suero hemolítico.

Etapa 4^a — Preparación de la mezcla hemolítica.

Etapa 5^a — Agregado de la mezcla hemolítica a los tubos de la reacción final e incubación.

Etapa 6^a — Lectura e interpretación de los resultados.

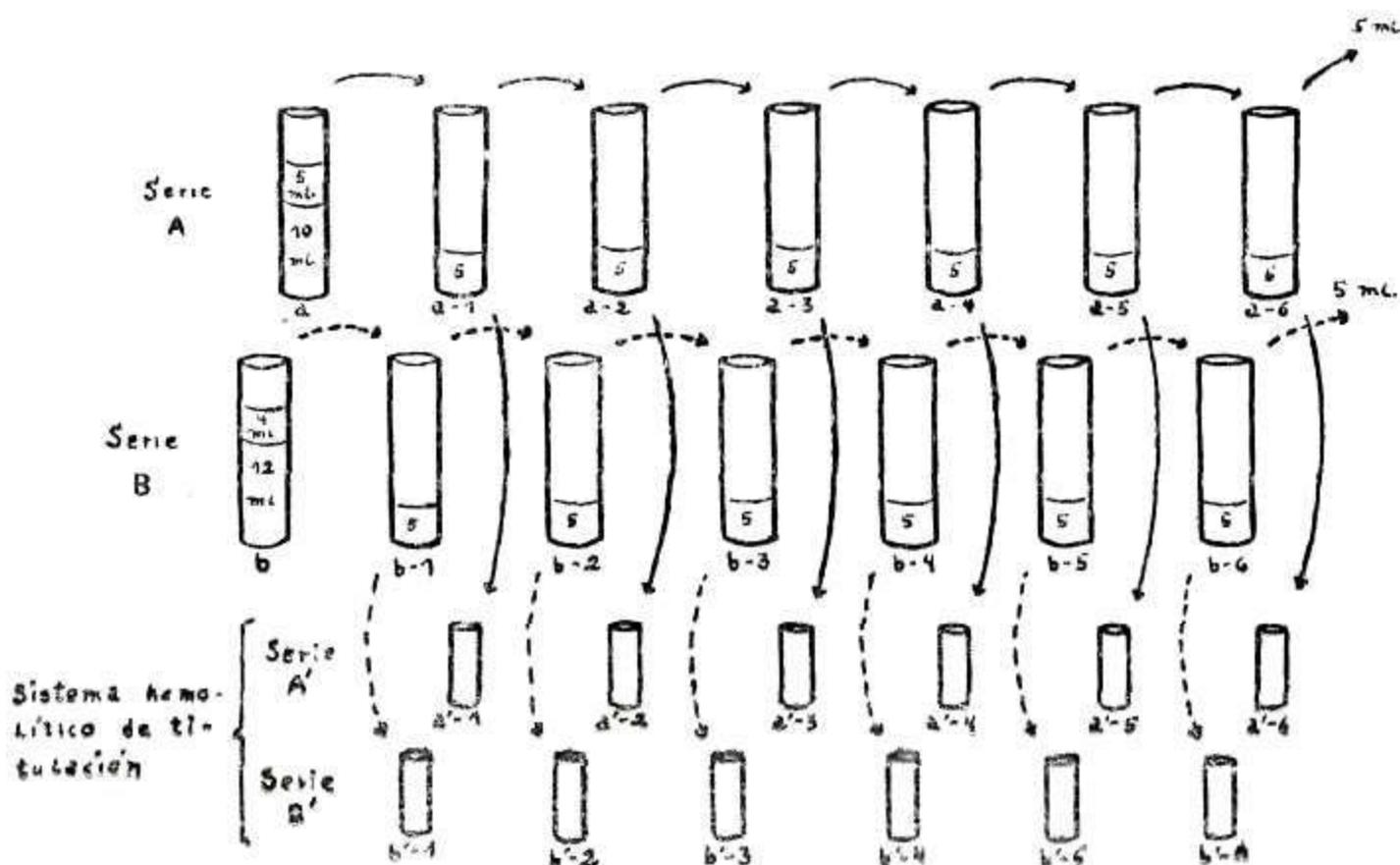
METODO OPERATORIO

Etapa 1^a — Se preparan dos gradillas: una para tubos de ensayo con 2 filas de 7 tubos c/una y otra gradilla para tubos de hemólisis con 2 filas de 6 tubos c/una. El esquema de la figura N^o 1 indica la relación entre los tubos y los respectivos pasajes de líquido:

En el tubo de ensayo *a* se coloca 10 ml. de sol. fisiológica y en los 6 restantes de la 1^a fila (serie A) 5 ml. en c/u.

En el tubo de ensayo *b* se coloca 12 ml. de sol. fisiológica y en los 6 restantes de la 2^a fila (Serie B) 5 ml. en c/u.

Se prepara una dilución del suero hemolítico a la concentración 1/100 con sol. fisiológica y de la misma se agrega 5 ml. al tubo *a* y 4 ml. al tubo *b*.



(Fig. 1)

Por pipeteo se mezcla el contenido del tubo *a*, obteniendo así una dilución de hemolisina al 1/300. De esta dilución se pasa 5 ml. al tubo *a*—1 y se mezcla por pipeteo, obteniendo una dilución 1/600 de la cual se pasa 0,5 ml. al primer tubo de hemólisis del sistema hemolítico de titulación (tubo *a'*—1 de la serie *A'*) y 5 ml. al tubo *a*—2 que se mezcla y del cual se pasa 0,5 ml. al tubo de hemólisis *a'*—2 y 5 ml. al tubo *a*—3. Se continúa en la misma forma hasta llegar al tubo *a*—6 del cual se pasa 4,5 ml. al *a'*—6 y se desechan 5 ml. De esta manera en cada uno de los tubos desde el *a*—1 al *a*—6 quedan 4,5 ml. de diluciones del suero hemolítico 1/600, 1/1200, 1/2400, 1/4800, 1/9600 y 1/19200 y en cada uno de los tubos de hemólisis de la serie *A'* 0,5 ml. de las diluciones correspondientes.

En el tubo de ensayo *b* con 12 ml. de sol. fisiológica se agrega 4 ml. de la dilución de suero hemolítico 1/100 y se mezcla obteniendo una dilución 1/400. Procediendo en idénticas condiciones que en las series anteriores se pasa 5 ml. al tubo *b*—1 (con 5 ml. de sol. fisiológica), se mezcla y pasa 0,5 ml. al tubo *b'*—1 y 5 ml. al *b*—2. Se continúa hasta agotar los tubos, desechando 5 ml. del tubo *b*—6. Se tiene así una segunda serie de tubos de ensayo con 4,5 ml. c/u de hemolisina en las siguientes concentraciones: 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800, 1/25600, y una segunda serie de tubos de hemólisis con 0,5 ml. c/u de las correspondientes diluciones de suero hemolítico.

A cada uno de los tubos de hemólisis de las dos series: *A'* y *B'*, se agrega 0,5 ml. de hematíes de carnero al 2 % y se incuban a 37°C. por 5 minutos. Posteriormente se agrega a cada tubo 0,5 ml. de dilución de complemento al 1/20 y 0,5 ml. de antígeno diluido según título.

Etapa 2ª — Para cada reacción se emplean tres tubos de hemólisis. Se mide el suero humano previamente inactivado a 56°C. 30 minutos (enfermo o testigos) y se coloca 0,05 ml. en el primer tubo, 0,10 ml. en el segundo y 0,10 ml. en el tercero. Se agrega el antígeno s/título, en la cantidad de 0,25 ml. en los tubos 1º y 2º únicamente reemplazándolo por 0,25 ml. de sol. fisiológica en el 3º. Se agrega 0,25 ml. de complemento diluido 1/20 a los tres tubos por igual y se agita bien.

Etapa 3ª — Se incuban (de preferencia en baño térmico) a 37°C. durante 30 minutos todos los tubos de hemólisis: el sistema hemolítico de titulación preparado en la etapa primera y los que comprenden la reacción propiamente dicha, preparada en la etapa segunda. Cumplido el tiempo, se retiran todos los tubos del baño y se observa la hemólisis producida en el sistema de titulación. La mayor dilución que produce hemólisis total es el título por cada serie.

Etapa 4ª — Conociendo los títulos de hemólisis total en las dos series del sistema de titulación se prepara la dilución de hemolisina a emplear mezclando íntimamente las correspondientes soluciones de suero hemolítico que han quedado de reserva en los tubos de ensayo (series A y B, fig. 1). Ejemplo: ha habido hemólisis total en los tubos a'—1, a'—2 y a'—3 de la serie A' y en los tubos b'—1, b'—2 y b'—3 de la serie B', es decir que el título útil estará entre las diluciones 1/2400 y 1/3200 cuya media aritmética es 1/2800. Mezclando el contenido de los tubos de ensayo correspondientes, o sea el a—3 y el b—3 obtenemos 9 ml. de dilución de suero hemolítico de título útil.

La mezcla hemolítica a emplear en la reacción final se prepara mezclando partes iguales de la dilución de suero hemolítico y suspensión de hematíes de carnero al 2 %. Las cantidades a preparar dependen del número de sueros que intervienen en la reacción, sabiendo que se necesita 1,5 ml. de mezcla hemolítica por cada suero. En el ejemplo presentado, se puede preparar hasta 18 ml. de mezcla hemolítica con los que se puede analizar, con comodidad, hasta 11 sueros incluyendo los testigos.

En el caso de necesitarse mayor cantidad de dilución útil de suero hemolítico se modificarán las cantidades a emplear en la etapa primera.

Etapa 5ª — Se agrega 0,5 ml. de la mezcla hemolítica a todos los tubos de la reacción incubados. Se agitan y se vuelven a poner a 37°C. durante 30 minutos al cabo de los cuales se retiran del baño.

Etapa 6ª — *Lectura e interpretación de los resultados.* Los tubos I y II son los verdaderos “tubos de la reacción” pues llevan suero, complemento y antígeno. El tubo III, que no lleva antígeno, es un control para detectar los sueros con poder anticomplementa-

rio, es decir los que son capaces de fijar el complemento en ausencia del antígeno específico, en cuyo caso no se produce la hemólisis. Es por ello que el tubo III siempre debe dar hemólisis total. Los sueros con poder anticomplementario no son aptos para la reacción de fijación del complemento.

El cuadro de la figura 2 resume la reacción total.

Debe hacerse intervenir por lo menos cuatro sueros testigos: dos negativos, uno positivo débil y otro fuertemente positivo.

Ausencia de hemólisis en los tubos I y II, y hemólisis en el III indica reacción fuertemente positiva y se informa (++).

Hemólisis en el tubo I, ausencia de hemólisis en el II y hemólisis en el III, indica reacción positiva débil y se informa (+).

Hemólisis en los tres tubos indica reacción negativa y se informa (—).

RESUMEN

Se describe una variante en el método operatorio de la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, divulgada por la Dirección de Lucha Contra la Enfermedad de Chagas del Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública de la Nación.

Se indica una manera sencilla de preparar la dilución del suero hemolítico con gran precisión eliminándose los errores que pueden cometerse, por una parte al trabajar con material mal calibrado y por otra los propios de las mediciones de pequeños volúmenes de líquido.

S U M M A R Y

A variant is described in the diagnosis technic, in the complement fixation test for Chagas'disease, published by the "Dirección de Lucha contra la Enfermedad de Chagas del Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública de la Nación".

A simple way of preparing with great accuracy the dilution of the haemolytic serum is given, eliminating the possible mistakes that could be committed, on the one hand due to wrongly calibrated instruments and on the other the usual one in the measurement of small amounts of liquid.

BIBLIOGRAFIA

- 1) GUERREIRO C., MACHADO A.: *A reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnostico.* Braz. Med., 27 : 225, 1913.
- 2) MANSO SOTTO A. E., LORETTI G. A., RÍSPOLI J. A.: *Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. — Reacción de Fijación del Complemento.* M. E. P. R. A. 79 : 5, 1950.
- 3) KELSER R. A.: *A Complement Fixation Test for Chagas Disease Employing an Artificial Culture Antigen.* Am. J. Trop. Med., 16 : 405, 1936.
- 4) DAVIS D. J.: *An Improved Antigen for Complement Fixation in American Tripanosomiasis.* Publ. Health Rep., 58 : 775, 1943.
- 5) MUÑIZ J., FREITAS G. 45: *Contribuição Para o Diagnostico da Doença de Chagas, pelas Reações de Imunidade.* Mem. Inst. Osw. Cruz, 41 : 303, 1944.
- 6) ROMAÑA C., DÍAS E.: *Reação de Fixação do Complemento na Doença de Chagas, com Antígeno Alcohólico de Cultura do Schizotrypanum cruzi.* Mem. Inst. Osw. Cruz., 37 : 1, 1942.
- 7) MANSO SOTTO A. E., LORETTI G. A.: *Cultivo del Tripanosoma cruzi.* M. E. P. R. A, 75 : 5, 1949.
- 8) CERISOLA J. A., ROSENBAUM M. B.: *La Reacción de Fijación del Complemento para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.* La Prensa Médica Arg. 45 (14) : 1454, 1958.
- 9) ROMAÑA C., GIL J.: *Reacción de Fijación de Complemento con Antígeno de Cultura de S. Cruzi en 500 Sueros Humanos.* An. Inst. Med. Reg. Tucumán, 1 : 297, 1946.
- 10) SILVA I. I.: *Método del Cultivo del Tripanosoma (Schizotrypanum) cruzi para la Preparación de Antígenos.* An. Ins. Med. Reg. Tucumán, 4 (1) : 71, 1954.