

ESTUDOS QUANTITATIVOS SOBRE O
FENÔMENO DA HEMÓLISE PASSIVA INDIRETA

Marlene Braide Serafin

Marlene Braide Serafim

ESTUDOS QUANTITATIVOS SOBRE O
FENÔMENO DA HEMÓLISE PASSIVA INDIRETA

INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia.

Orientador: H. A. Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas
Campinas, 1974

A meus pais
meu esposo
minha filha

Desejamos expressar nossa profunda gratidão ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel, pela orientação segura e constante que imprimiu a este trabalho, e sem cujo apoio nada teríamos feito.

AGRADECIMENTOS

O orientador e a autora desejam externar seus agradecimentos às seguintes pessoas e instituições que contribuíram para tornar possível este trabalho.

Prof. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da UNICAMP, pelo apoio moral e material dado aos trabalhos de pesquisas deste Departamento.

Prof. Walter A. Hadler, Diretor do Instituto de Biologia, pelo estímulo dado ao desenvolvimento da pesquisa nesta Instituição.

Prof. Joseph Miller, do Instituto de Química da UNICAMP, pela orientação na síntese do 4'-4'-Bifenil-bis-diazonio-fluoroborato.

FAPESP, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro dado aos programas de pesquisa do Departamento.

Organização Mundial de Saúde (Division of Immunology) e a BIREME, pela assistência de material bibliográfico.

Aos colegas que contribuíram com a sua crítica.

ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
Anti-SGC	Anti-soro globulina de coelho
BDB	Benzidina-Bis-Diazotada
BDF	4'4' Bifenil-Bis-Diazonio-Fluoroborato
C	Complemento
FH	Fibrinogênio humano
Hem	Hemácias
Hem.Amb	Hemácias amboceptor
Hem.Ag.....	Hemácias sensibilizadas com o antígeno
Hem.Ag.Ac	Hemácias sensibilizadas com o complexo antígeno-anticorpo
Ov	Ovalbumina
SAB	Soro Albumina Bovina
SAE	Soro Albumina Equina
SAH	Soro Albumina Humana

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	8
RESULTADOS	16
1. Fatores que interferem no fenômeno da hemólise passiva indireta	16
1.1. Doses de antígeno e de ligante	16
1.2. Temperatura de conjugação	19
1.3. Duração da conjugação	19
2. Dosagem de diferentes soros anti-proteínas	20
3. Dosagem de antígenos	21
DISCUSSÃO	27
RESUMO E CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

INTRODUÇÃO

Dentre os fenômenos dependentes da presença de complemento (C) o da lise específica foi o mais explorado para estabelecer técnicas quantitativas para detecção do complexo antígeno-anticorpo (Ag.Ac), graças a descoberta de relações matemáticas entre a quantidade de complemento e o grau de lise (VON KROGH, 1916). Esta descoberta permitiu o desenvolvimento de esforços (WADSWORTH et al., 1931, 1938; MALTANER & MALTANER, 1939), orientados no sentido de estabelecer técnicas de dosagens baseadas na unidade correspondente a 50% de lise (CH_{50}). Com a introdução do espectrofotômetro como instrumento de medida (FRIEDWALD, 1943; MAYER et al., 1946; KENT et al., 1946) possibilitando avaliar com precisão o grau de lise, foram elaborados métodos extremamente sensíveis para dosagens de antígenos e anticorpos. (MAYER et al., 1948; MALTANER & GNESH, 1948; WASSERMAN & LEVINE, 1961).

Esses métodos se baseiam, necessariamente, no pressuposto da existência de uma proporcionalidade entre a quantidade de complexo Ag.Ac e a quantidade de C fixado. De fato, numerosos estudos vieram mostrar que essa relação pode ser observada quando, utilizando um dado imune-soro, são investigadas, em condições ótimas, as relações entre a quantidade de C fixado e a quantidade de anticorpo adicionado ao sistema (OSLER, 1958). Contudo, a comparação de diferentes imune-soros, obtidos de diferentes indivíduos ou de diferentes espécies animais, mostrou que a capacidade de fixação do C é variável de um soro para outro. Alguns imune-soros tem uma alta capacidade de fixar C, enquanto outros não o fazem ou o fazem muito fracamente, não havendo uma relação direta entre

quantidade de C fixado e quantidade de anticorpo presente nos diferentes soros.

A análise desse fato mostrou que a capacidade de os imune-soros fixarem C é dependente da natureza das imunoglobulinas aí presentes. Algumas imunoglobulinas, como a IgM, são altamente eficazes no processo de fixação do C (BORSOS & RAPP, 1965) enquanto outras, como algumas imunoglobulinas, sub-classes de IgG, são incapazes de fixar C (BLOCH et al, 1963). Ademais, as observações de que algumas imunoglobulinas são capazes de fixar o C através da via alternada (SANDBERG, et al, 1970) introduz uma dificuldade adicional na tentativa de estabelecer uma correlação entre capacidade de fixação de C e teor de anticorpos em diferentes soros. A impossibilidade de se estabelecer esta correlação representa, obviamente, uma desvantagem das técnicas de dosagem baseadas no fenômeno da lise específica.

Do ponto de vista técnico, os testes de fixação são de fácil execução. Adiciona-se ao sistema Ag.Ac em estudo uma quantidade de C previamente dosado e, no final da reação determina-se a quantidade de C não absorvida pelo complexo Ag.Ac. A determinação da quantidade de C é feita através do uso do sistema de hemácias sensibilizadas pelo amboceptor e a quantidade de C fixado e, conseqüentemente de anticorpo é então obtida pela diferença entre a quantidade de C presente no início e no fim da reação.

Numerosos dados foram acumulados sugerindo que as técnicas que utilizam o fenômeno da hemólise específica poderiam ser simplificadas, omitindo-se a necessidade de dosagens comparativas de C e a necessidade de utilização de um sistema indicador (Hem.amb) não relacionado ao sistema Ag.Ac

em estudo. Nesses sistemas simplificados, o grau de lise seria diretamente relacionado à quantidade de anticorpo presente.

Alguns antígenos bacterianos tem a capacidade de se fixar à superfície das hemácias. MIDDLEBROOK & DUBOS, (1948), mostraram que os soros de pacientes tuberculosos tem a propriedade de aglutinar especificamente hemácias tratadas previamente com uma fração polissacarídica extraída do Mycobacterium tuberculosis.

Em 1950, MUNIZ descreveu o fenômeno da "hemólise condicionada". Hemácias tratadas com polissacarídeos extraídos do Schizotrypanum cruzi eram aglutinadas especificamente pelos soros de pacientes com doença de Chagas e lisavam quando se adicionava complemento ao sistema. Esse autor mostrou que o fenômeno lítico era dependente da ação simultânea concorrente do anticorpo e do complemento e que nesses ensaios em que um excesso de C era utilizado, o grau de lise era proporcional a quantidade de anticorpo.

Várias observações se acumularam evidenciando que fenômenos semelhantes poderiam ser observados utilizando-se hemácias previamente sensibilizadas com determinadas frações polissacarídicas ou proteicas extraídas de diferentes espécies bacterianas: M. tuberculosis (FISHER & KEOGH, 1950) ; Escherichia coli e Salmonella typhi (ADLER, 1950); M. Tuberculosis (MIDDLEBROOK & DUBOS, 1950); Pasteurella tularensis (FEINBERG & WRIGHT, 1951); tuberculina bruta (ALMEIDA & AZEVEDO, 1952); extrato de gonococo (MELAND, 1966).

Para designar esse fenômeno foi proposta a expressão hemólise passiva (BIER, 1951). O termo passiva, mais coerente

te com a terminologia imunológica, caracteriza melhor o fenômeno do que o termo condicionada, porquanto a hemácia recebe passivamente o antígeno.

Estudos quantitativos, realizados utilizando um polissacarídeo extraído da S. typhi e o anti-soro específico desta Salmonella (BIER, et al, 1956) mostraram a possibilidade de se encontrar condições ótimas para o estabelecimento de técnicas quantitativas precisas para titulação de anticorpos baseadas no fenômeno da hemólise passiva.

Os sistemas estudados pelos diferentes autores acima citados tinham em comum o fato de utilizarem antígenos que se adsorviam à superfície de hemácias, característica esta, própria de alguns antígenos polissacarídicos (HAMMERLING & WESTPHAL, 1967). Normalmente, a grande maioria dos antígenos, principalmente os proteicos, não se adsorvem às hemácias. Por outro lado, o fenômeno de adsorção é reversível, complicando a interpretação dos resultados.

Para fixar os antígenos às hemácias, várias substâncias foram usadas. Algumas dessas substâncias funcionam através de ligações fracas não covalentes tais como o ácido tânico (BOYDEN, 1951; FISHER, 1952; BOURDUAS & GRABAR, 1953; STAVITSKY, 1954 e BUTLER, 1963) e cloreto crômico (GOLD & FUDENBERG, 1967). Outras substâncias - os reagentes bifuncionais - funcionam através de ligações covalentes estáveis: benzidina-bis-diazotada, (PRESSMAN et al, 1942; STAVITSKY & ARQUILLA, 1958 e BUTLER, 1963); 1,3 difluor, 4,6 dinitrobenzeno, (LING, 1961); tolylenol - 2,4 diisocianato (GYENES & SEHON, 1964); carbodiimida, (JOHNSON et al, 1966); glutaraldeído, (ONKELINX et al, 1969).

As hemácias contendo antígeno artificialmente ligado a sua superfície podem ser aglutinadas em presença de anti-corpo específico para aquele antígeno, e, permitindo o estabelecimento de métodos sensíveis para a detecção desses anticorpos. Contudo, as técnicas de hemaglutinação são semiquantitativas.

Técnicas quantitativas podem ser estabelecidas convertendo-se a aglutinação em hemólise específica, pela adição do complemento (STAVITSKY, 1954). Esta conversão contudo não é possível quando se usam determinados agentes ligantes, tais como o ácido tânico (PECK et al, 1949; STAVITSKY, 1954) que alteram profundamente as propriedades das hemácias.

A ligação covalente obtida através da reação de conjugação tem sido largamente utilizada para ligar antígenos à hemácias. Quando o antígeno possui um grupo arilamina, este grupo pode ser diazotado e o antígeno pode ser conjugado diretamente à hemácia. SILVERSTEINER & MALTANER, (1952) diazotaram o ácido para-amino fenilarsônico e o conjugaram à hemácia. Essas hemácias, contendo aquele grupo haptênico, aglutinavam e lisavam quando em presença de anticorpo anti para-amino fenilarsonato e C.

No caso dos antígenos proteicos, geralmente, utiliza-se a benzidina bis-diazotada (BDB), reagente bifuncional capaz de se ligar simultaneamente à hemácia e ao antígeno. STAVITSKY & ARQUILLA, (1950) ligaram deste modo a insulina à hemácia, estabelecendo uma técnica de hemólise passiva para detecção de anticorpos anti-insulina.

RANGEL & REPKA, (1965) estudaram os fatores que interferem na conjugação do antígeno à hemácia e ressaltaram a

importância do controle rígido de determinados fatores tais como a temperatura da reação e a relação entre as quantidades de hemácias, antígeno e BDE, a fim de se obter maior sensibilidade e especificidade na reação de hemólise passiva. Com hemácias sensibilizadas em condições ótimas, foi possível estabelecer um método para dosagens de anticorpos anti-soro albumina bovina cuja sensibilidade é comparável à referida, para os métodos de dosagem por fixação do C (12 ugN Ac/ml).

O conjunto de informações disponíveis sobre o fenômeno da hemólise passiva mostra que é possível estabelecer-se métodos para a dosagem quantitativa de anticorpos, com sensibilidade e especificidade semelhantes às obtidas com os métodos de fixação do complemento, desde que seja possível ligar-se o antígeno à hemácia sem alterações profundas das suas propriedades.

Este fenômeno se processa essencialmente em dois estágios: 1) combinação do anticorpo com o antígeno artificialmente fixado à hemácia, formando o complexo Hem.Ag.Ac; 2) interação deste complexo com o C, e consequente lise das hemácias. A ocorrência de lise em tais sistemas depende essencialmente da natureza do anticorpo utilizado. Alguns anticorpos, incapazes de fixar o C, não podem ser detectados por este método.

Algumas observações indicam no entanto, que este inconveniente pode ser contornado. RANGEL & REPKA, (1965) relataram observações preliminares indicando a possibilidade de se detectar anticorpos incapazes de fixar C, através do uso de soros anti-soro gama globulina (anti-SG) apropriados. HUMPHREY, (1967) mostrou que hemácias sensibilizadas com uma

quantidade de amboceptor incapaz de provocar a lise na presença de excesso de C, podiam ser lisadas quando submetidas a ação de determinados soros anti-SG. RANGEL, (1968) utilizou a expressão "hemólise passiva indireta" para designar este fenômeno e mostrou que nesses sistemas a lise é uma função diretamente relacionada à quantidade de anticorpo combinado com o antígeno fixado à superfície da hemácia. Mostrou ainda que a ocorrência de lise independe da natureza desses anticorpos mas está estritamente relacionada à natureza dos soros anti-SG.

No presente trabalho procuramos verificar a possibilidade de utilizar o método da hemólise passiva indireta para determinação quantitativa de diferentes anticorpos anti-proteínas, empregando-se a BDB ou BDF para sensibilizar hemácias com diferentes antígenos.

MATERIAL E MÉTODOS

ANTI γ GENOS - A soro albumina bovina (SAB) foi obtida da Pentex Co., Kankakee, Illinois. A soro albumina equina (SAE) cristalizada 5 vezes, foi preparada pelo método de ADAIR & ROBINSON, conforme KABAT & MAYER (1961). A soro albumina humana (SAH) cristalizada foi obtida da Nut.Biochem.Co.. O fibrinogênio humano (FH) foi obtido da Heemoderivate Immunogellschaft, Wien 22. A ovalbumina (Ov) 3 vezes cristalizada, foi preparada pelo método de KECKWICK, de acordo com as indicações de KABAT & MAYER (1961).

IMUNE-SOROS - Os imune soros, anti-SAB, anti-SAE, anti-SAH, anti-FH e anti-Ov foram obtidos em coelhos imunizados de acordo com o esquema indicado por RANGEL (1965) para os soros anti-SAB.

Os imune-soros, anti-soro globulina de coelho (anti-SGC) foram obtidos através da imunização de cobaias, segundo as indicações de RANGEL (1969), ou de carneiros, conforme as indicações de ESTEVES et al, (1974).

COMPLEMENTO - Uma mistura de soros obtidos de cerca de 20 a 30 cobaias normais, foi utilizado como fonte de complemento. O complemento foi conservado liofilizado ou em porções de 1 ml mantidas a -20°C até o momento de uso.

A determinação do CH₅₀ das diferentes partidas de complemento foi realizada segundo indicações de MAYER et al (1948).

SOLUÇÕES TAMPÕES - O tampão veronal sódico contendo gelatina, segundo as indicações de STEIN and VAN NGU (1950), foi preparado de acordo com as instruções fornecidas por MAYER et al, (1948).

A solução de salina fosfatada foi preparada misturando volumes iguais de NaCl 0,15 M e tampão 0,15 M pH 7,4, segundo RANGEL & REPKA (1965).

BENZIDINA-BIS-DIAZOTADA (BDB) - A BDB foi preparada de acordo com as instruções de KABAT & MAYER, (1961). Cada partida de BDB era previamente titulada procurando determinar a concentração de BDB que permitia preparar hemácias sensibilizadas com SAB, capaz de, em experiências de hemólise passiva direta, fornecer 50% de lise frente a $0.12 \pm 0.01 \mu\text{g}$ NAc/ml de anti-SAB.

4'4' BIFENIL-BIS-DIAZONIO-FLUOROBORATO (BDF) - Foi preparado de acordo com as instruções de ROE (1967).

Porções de 64,4 g (0,25 mole) de dihidrocloridrato de benzidina dissolvido em 91 ml (0,57 mole) de ácido fluorobórico foram misturadas a 250 ml de H₂O destilada. Esta mistura mantida abaixo de 10°C foi diazotada lentamente com agitação constante, utilizando-se 17,3 g de nitrito de sódio (0,26 mole) dissolvido em 35 ml de H₂O.

O precipitado formado, constituído pelo 4'4' bifenil-bis-diazonio-fluoroborato era então lavado a frio sucessivamente com 40 ml de ácido fluorobórico a 5%, 50 ml de metanol e 50 ml de eter.

O produto foi cristalizado a partir da solução saturada de BDF em ácido fluorobórico a 5%. O ponto de fusão dos cristais, determinado em microscópio de fusão, foi de 137°C, igual portanto, ao do composto preparado por ROE (1967), que apresenta a estrutura abaixo indicada.



DETERMINAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS - O teor de hemoglobulina e o grau de lise eram estimados através da determinação da D.O., $\lambda = 550$, em cubetas 12x75, utilizando-se um espectrofotômetro Coleman Júnior.

SUSPENSÃO PADRONIZADA DE HEMÁCIAS DE CARNEIRO - As hemácias de carneiro foram obtidas misturando-se partes iguais de solução de Alsever e sangue esteril de carneiro. Alíquotas de 10 ml dessa suspensão eram distribuídas assepticamente, em tubos e mantidas a 5°C. Nas reações foram utilizadas hemácias conservadas entre 5 a 40 dias. No momento de uso, essas suspensões de hemácias eram lavadas em solução salina fosfatada.

A padronização da suspensão de hemácias era realizada através da determinação do teor de hemoglobulina das suspensões diluídas a 1:20 em água destilada. Após a lise das hemácias o teor da hemoglobina era estimado espectrofotometricamente. Suspensões fornecendo D.O. = 0.42, nestas condições, eram utilizadas para reações de conjugação.

SENSIBILIZAÇÃO DAS HEMÁCIAS - Porções de 5 ml de suspensão padronizada de hemácias, mantidas a 0°C, eram misturadas a 0,5 ml de antígeno na concentração adequada. A essa mistura eram adicionados 5 ml de BDB recentemente diluída a (40 μ M) em salina fosfatada. Após incubação a 0°C, durante 30 minutos, as hemácias eram lavadas uma vez em salina fosfatada e duas vezes em tampão veronal.

Nas experiências em que o BDF foi empregado, uma solução desse reagente (5 mg/ml) em HCl 0,1 N era preparada. Aliquotas dessa solução, no momento do uso, eram diluídas a (0,2 μ M) em uma solução fosfatada gelada. Porções de 5 ml dessas soluções diluídas eram utilizadas para conjugar o antígeno a hemácia em condições semelhantes a acima descrita para a BDB.

As suspensões de Hem.Ag. eram padronizadas de modo que a diluição 1/5 em água destilada fornecesse uma D.O. = 0.42.

HEMÓLISE PASSIVA DIRETA - Esta técnica foi executada segundo as indicações de RANGEL & REPKA (1965), utilizando-se os seguintes volumes de reagentes: 1 ml de diferentes diluições do soro; 0,5 ml de tampão veronal; 0,5 ml de suspensão padronizada de Hem.Ag, incubadas a 37°C, 30 minutos. Após este período era adicionado, em todos os tubos, 0,5 ml de uma diluição de C contendo 10 CH₅₀/ml. As misturas eram reincubadas a 37°C durante 45 minutos e o grau de lise era determinado espectrofotometricamente, após a centrifugação a 5°C, 433 g, durante 5 minutos.

Como controle dessas reações eram usados tubos con-

tendo apenas:

- 1) Hem.Ag, C e tampão;
- 2) Hem.Ag, Ac na maior concentração utilizada na experiência e tampão.

DETERMINAÇÃO DO TÍTULO HEMOLÍTICO DOS IMUNE-SOROS - Nas experiências de hemólise passiva a correlação entre o grau de lise e quantidade de Ac é descrita pela equação de VON KROGH:

$$x = K (y / 1-y)^h$$

onde, x representa a quantidade de anticorpo; y a porcentagem de hemólise; h uma constante dependente das condições experimentais, e K é igual a quantidade de anticorpo capaz de lisar 50% de Hem.Ag.

O valor de K era determinado, graficamente, em papel logarítmico, utilizando-se um sistema de coordenadas, em cujas ordenada e abcissa estavam representados respectivamente os valores de x e da função $(y / 1-y)$.

TITULAÇÃO DOS SOROS DE COBAIA ANTI-GAMA-GLOBULINA DE COELHO (ANTI-SGC) - Os soros anti-SGC, foram titulados a fim de se determinar o número de unidades hemolíticas (UH/ml) estabelecendo-se que uma unidade hemolítica é a menor quantidade de anti-SGC capaz de lisar 100% de Hem.Ag.Ac, contendo a menor quantidade de Ac.

A determinação do número de UH/ml dos soros anti-SGC foi feita, utilizando-se titulações em bloco, em que diferentes diluições de anti-SGC eram testadas contra Hem.Ag.Ac con

tendo diferentes concentrações de Ac, em condições semelhantes às indicadas para hemólise passiva indireta.

HEMÓLISE PASSIVA INDIRETA - A técnica da hemólise passiva indireta foi realizada segundo as indicações de RANGEL (1968), em duas etapas:

1) *Sensibilização das hemácias com o complexo antígeno-anticorpo (Hem.Ag.Ac)* - Em tubos graduados para 5 ml, porções de 2,5 ml de suspensão de hemácias sensibilizadas eram misturadas com 5 ml de diferentes diluições de anti-soro específico e a mistura incubada a 37°C durante 2 horas. Em seguida as hemácias sensibilizadas com o complexo (Hem.Ag.Ac) eram lavadas 3 vezes em tampão veronal e o volume completado para 5 ml.

2) *Desenvolvimento da lise em presença de anti-SGC e Complemento* - Para verificação da atividade hemolítica de Hem.Ag.Ac foram utilizados os seguintes volumes de reagentes: duplicatas de 1 ml de suspensão de Hem.Ag.Ac, foram misturadas com 1 ml de anti-SGC (1 UH/ml) e a mistura incubada a 37°C durante 30 minutos. Após este período, eram transferidas para banho de gelo, acrescentando-se 0,5 ml de complemento contendo 10 CH₅₀/ml e reincubadas a 37°C durante 45 minutos.

O grau de hemólise era determinado após centrifugação a 5°C, 433 g durante 5 minutos através da determinação espectrofotométrica.

Controle: em cada experiência eram utilizados 2 controles:

1) Hem.Ag, anti-SGC e Complemento;

2) Hem.Ag.Ac e Complemento.

O valor de K era obtido conforme indicado para hemólise passiva direta.

REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA HEMÓLISE ESPECÍFICA - A reação era executada utilizando-se os seguintes volumes de reagentes: porções de 0,5 ml de uma diluição de Ac contendo uma concentração correspondente a 2K, eram misturadas com 0,5 ml das soluções em diferentes concentrações de Ag. As misturas eram incubadas durante 2 horas a 37°C. Após este período, porções de 0,5 ml da suspensão Hem.Ag eram adicionadas a todos os tubos e a mistura era reincubada durante 2 horas a 37°C. As hemácias, contidas em tubos graduados eram então lavadas 3 vezes em tampão veronal, completando-se finalmente o volume para 1 ml. Porções de 1 ml de uma diluição de soro anti-SGC contendo 2 unidades hemolíticas/ml, eram adicionadas a todos os tubos que eram então reincubadas por 30 minutos a 37°C. Após este período era adicionado a cada tubo 0,5 ml de Complemento contendo 10 CH₅₀/ml incubando-se em seguida as misturas, por 45 minutos a 37°C.

Controles: foram utilizados 3 controles:

- 1) Hem.Ag + Ac contendo 2K, anti-SGC e C
- 2) Hem.Ag + Ac contendo 1K, anti-SGC e C
- 3) Hem.Ag + Ag na maior concentração empregada, anti-SGC e C.

REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO - Reações de precipitação foram realizadas pelo método de HEIDELBERGER & KENDALL, usando o reagente de biureto, para determinar a quantidade de protei-

nas precipitadas, de acordo com as instruções de KABAT and
MAYER, (1961).

RESULTADOS

1. *Fatores que interferem no fenômeno da hemólise passiva in direta*

Os fatores que interferem na hemólise passiva indireta foram estudados através de grupos de experiências orientadas no sentido de estabelecer as condições ótimas de conjugação do antígeno às hemácias.

1.1. *Dose de antígeno e de ligante*

O estabelecimento de condições ótimas para a conjugação de antígenos às hemácias foi realizado através de experiências de conjugação em que porções de 5 ml de suspensão padronizada de hemácias eram misturadas, a 0°C, com quantidades variáveis de antígenos e do ligante bifuncional. Os reagentes eram mantidos a 0°C durante toda a experiência e a conjugação era realizada, nesta mesma temperatura, durante 30 minutos. Após este período as hemácias sensibilizadas eram lavadas, padronizadas e utilizadas em experiências de hemólise passiva direta e indireta. Os valores de K e h determinados nessas experiências eram comparados.

Os dados obtidos pela hemólise passiva direta foram paralelos aos obtidos pela hemólise passiva indireta (Tabela I). Para cada concentração de antígeno estudado, a sensibilidade maior da lise foi sempre alcançada com hemácias sensibilizadas usando BDB na concentração de 40 μ M, (Figura 1): a concentração final de antígeno, durante a conjugação, permitindo obter hemácias otimamente sensibilizadas variou, co-

TABELA I

Correlação entre os resultados obtidos pelos métodos direto e indireto da hemólise passiva. Influência da quantidade de ovalbumina usada para sensibilizar as hemácias.

Concentração de Ov (mg/ml) durante a conjugação	Valores de K (ngNAc/ml)		Relação A/B
	A) Método direto	B) Método indireto	
0,5	250	18	13.8
1,0	220	16	13.7
2,0	150	11	13.6
4,0	110	8	13.7
6,0	100	7	14.1

mo esperado, com a natureza do antígeno e foi de 1,0 mg/ml para SAB e 2,0 mg/ml para SAE, SAH e FH.

Hemácias sensibilizadas com concentrações de BDF e Ag diferente das acima indicadas, foram sistematicamente menos sensíveis à lise específica conforme indicado pelos achados de maiores valores de K. Uma exceção a esta regra pareceu ocorrer com a Ov, porquanto, com concentrações de 0,5 a 6,0 mg/ml, a medida que a concentração aumentava, o valor de K decrescia tendendo aparentemente para um valor assintótico (Tabela I).

Experiências similares às acima citadas foram realizadas utilizando-se o BDF como ligante. Resultados semelhan-

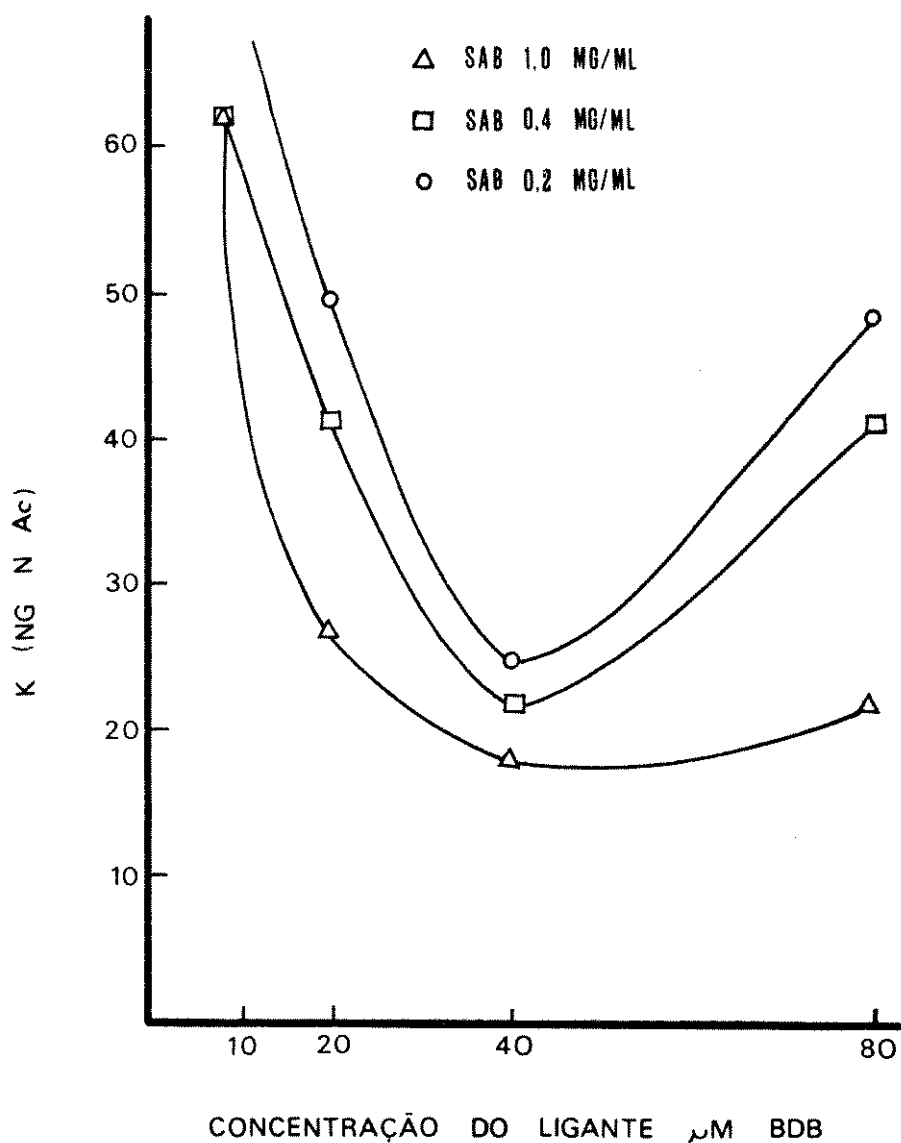


Fig. 1 - Sensibilização à lise específica das hemácias conjugadas ao SAB utilizando concentrações variáveis de BDB e diferentes concentrações de SAB.

tes aos obtidos com a BDB foram encontrados, indicando a necessidade de se utilizar, durante a conjugação, uma concentração final de BDF igual a $(0,2 \mu M)$ para que se obtivesse hemácias sensibilizadas em condições ótimas.

1.2. *Temperatura de conjugação*

Dois lotes de hemácias sensibilizadas foram preparadas em iguais condições com exceção da conjugação que foi realizada uma a $0^{\circ}C$ e a outra a $37^{\circ}C$.

A comparação desses lotes, utilizando-se um mesmo soro, não mostrou diferença significativa nos valores de K. Uma considerável diferença nos valores de h, no entanto, foram observadas. Enquanto o lote de hemácias sensibilizadas a $0^{\circ}C$ exibia valores de $h = 0.22 \pm 0.02$ o lote de hemácias sensibilizadas a $37^{\circ}C$ fornecia valores de $h = 0.36 \pm 0.06$.

Diferenças foram também observadas entre esses dois lotes de hemácias sensibilizadas em relação à lise não específica. As células sensibilizadas a $37^{\circ}C$ exibiram um pronunciado grau de lise espontânea. Esse efeito era sobretudo encontrado nos lotes de células tratadas com altas concentrações de BDB ou BDF. Em condições similares, praticamente nenhuma lise foi observada com células sensibilizadas a $0^{\circ}C$.

1.3. *Duração da conjugação*

A influência da duração do tempo permitido para conjugação do antígeno à hemácia, foi investigada, utilizando-se, como antígenos SAB e SAE. Suspensões de hemácias foram

sensibilizadas a 0°C, usando quantidades ótimas de BDB e de antígeno, permitindo que a reação se processasse por períodos variáveis de tempo (de 15 a 60 m). As hemácias sensibilizadas foram então testadas tanto pelo método direto quanto pelo indireto frente a uma dose de soro específico correspondente a 1 K.

Os resultados obtidos (Tabela II), indicaram que utilizando-se o SAB como antígeno, a variação do tempo de conjugação aparentemente não teve influência no grau de sensibilização das hemácias. Contrariamente, utilizando-se o SAE como antígeno, o tempo de conjugação exerceu ponderável influência no grau de sensibilização das hemácias.

TABELA II

Sensibilidade da lise específica das células sensibilizadas com SAB e SAE, preparadas variando a duração do tempo de conjugação. Resultados expressos com média de porcentagem de lise de experiências de duplicatas de hemólise passiva in direta.

Antígeno	Tempo de conjugação (em minutos)			
	15	30	45	60
SAB	50.0	51.2	51.5	50.0
SAE	32.5	41.2	50.3	57.0

2. Dosagem de diferentes soros anti-proteínas

O teor de anticorpos de diferentes imune-soros foi determinado através da técnica de precipitação em meio líquido de Heidelberger e Kendall. A seguir, esses anticorpos foram titulados utilizando-se as técnicas direta e indireta da hemólise passiva, empregando-se hemácias sensibilizadas em condições ótimas.

Os resultados apresentados na Tabela III mostram que o método da hemólise passiva indireta é extremamente sensível sendo capaz de detectar cerca de 7 a 12 ng NAc/ml, dependendo do sistema particular utilizado. Mostram ainda que alguns anticorpos, como no caso do soro anti B(I) que não puderam ser detectados pelos testes de precipitação e de hemólise passiva direta, podem ser titulados através do método indireto de hemólise passiva. Pode-se observar também naquela tabela que a relação dos valores de K obtidos pelos métodos direto e indireto apresenta uma ampla variação (9,4 a 32,2).

3. Dosagem de antígenos

A curva de precipitação e a zona de equivalência de um soro anti-SAB foram determinados de acordo com a técnica de Heidelberger e Kendall. O conteúdo total de anticorpos deste soro (320 μ g NAc/ml) era precipitado quando 32 μ g NAg era adicionado a 1 ml desse soro. Uma solução, contendo 32 ng NAc/ml foi então preparada em tampão veronal e alíquotas de 10 ml desta solução foram misturadas com quantidades variáveis de SAB. O volume de cada mistura foi completado para 20 ml e as misturas, primeiramente incubadas em banho-maria a 37°C por 2 horas, foram deixadas em banho de gelo durante 24 horas. Dois controles foram incluídos: um contendo somente anticorpos e o outro contendo a quantidade mais alta

TABELA III

Resultados dos testes de precipitação e de hemólise passiva direta e indireta de diferentes soros.

Soro	Teste de precipitação (mg NAc/ml)	Valor de K (ng NAc/ml)		Relação A/R
		A) Método direto	B) Método indireto	
Anti-Ov				
nº 1	1,0	139	6,7	20,7
nº 2	2,1	111	7,0	15,8
nº 3	1,5	120	7,5	16
nº 4	0,6	111	7,0	15,8
Anti-HF				
H-1	0,07	85	9,0	9,4
H-2	0,08	83	8,9	9,4
H-16	0,16	91	9,1	10
H-18	0,50	100	9,0	11
H-19	0,16	110	9,3	11,8
Anti-HF				
nº 1	0,64	146	11,3	12,5
Anti-SAE				
nº 3	1,1	355	11,0	32,2
nº 28	4,5	176	11,2	15,7
nº 29	4,9	165	12,2	13,5
nº 52	1,7	112	11,9	9,4
Anti-SAB				
D-1	0,32	106	8,8	12
D-1A	0,21	140	9,0	15
D-2	1,80	120	8,6	13,9
D-3	1,10	115	8,9	12,9
D-4	0,58	134	9,6	13,9
D-5	0,37	132	9,2	14,2
D-8	0,74	127	8,9	14,2
D-9	0,64	130	9	14,6
D-10	0,25	86	9	9,6
D-11	0,88	142	9	15,6
Anti-B(I)				
nº 1	0,0	0	(450)	

de antígeno usado no teste. Diluições seriadas de cada mistura foram feitas e os testes de hemólise passiva indireta foram realizados, em triplicata, com alíquotas de cada diluição para determinar os valores de K e h para cada mistura. A quantidade de anticorpo combinada com o antígeno adicionado foi calculado, admitindo-se que o complexo antígeno-anticorpo não reage com as células sensibilizadas com SAB.

Admitindo-se esta hipótese o anticorpo combinado pode ser calculado pela fórmula:

$$Ac_{(n)} = Ac_{(0)} \left(\frac{K_{(n)} - K_{(0)}}{K_{(n)}} \right)$$

onde, $Ac_{(0)}$ concentração inicial de anticorpo; $Ac_{(n)}$ representa a quantidade de Ac combinado com Ag; $K_{(0)}$ e $K_{(n)}$ valores de K encontrados para as misturas contendo zero e n quantidade de antígeno.

Alguns dos resultados obtidos acham-se apresentados na Tabela IV. Pode-se observar que os valores de K aumentam a medida que aumenta a quantidade de antígeno, ao passo que os valores de h se mantem constantes para as misturas contendo 0 a 32 ngN, aumentando em seguida, a medida que a concentração de antígeno aumenta. Observa-se ainda que a relação $Ac(n)/Ag$ aumenta gradativamente a medida que a concentração de antígeno aumenta, atingindo um máximo quando 32 ng NAg foi usado, decrescendo em seguida e apenas 122,0 ng NAc ou seja, 38% dos anticorpos presentes, estavam "combinados" com 32 ng de antígeno.

Resultados similares aos acima descritos, foram observados quando mistura contendo 3.200 ng NAc e quantidades

TABELA IV

Inibição específica da hemólise passiva indireta (conteúdo total de anticorpos = 320 ng N Ac).

Ag (ng N)	K (ml)	h	ng N Ac "combinado" Ac(n)	Relação Ac(n)/Ag
0	0.44	0.47	0	
8	0.44	0.47	0	
16	0.47	0.47	20.4	1.4
24	0.58	0.47	77.1	3.3
32	0.71	0.47	122.0	3.8
48	0.98	0.58	176.0	3.7
80	1.70	0.70	236.8	3.0
112	2.45	0.75	262.4	2.4
160	3.25	0.92	276.8	1.7

variáveis de antígeno foram estudadas. Apenas 53% dos anticorpos estavam "combinados" quando 320 ng N Ag foram adicionados. Os valores de $h = 0.47$ foram igualmente observados quando quantidades iguais ou inferiores a 320 Ng N Ag, estavam presentes na mistura. As misturas contendo quantidades maiores de antígeno apresentavam valores de h mais altos, aumentando esses valores a medida que a quantidade de antígeno aumentava. A relação $Ac(n)/Ag$ atingiu seu valor máximo para misturas contendo 320 ng N Ag.

Os resultados obtidos nas duas experiências acima citadas, são comparados na figura 2. A fim de reduzir os dados

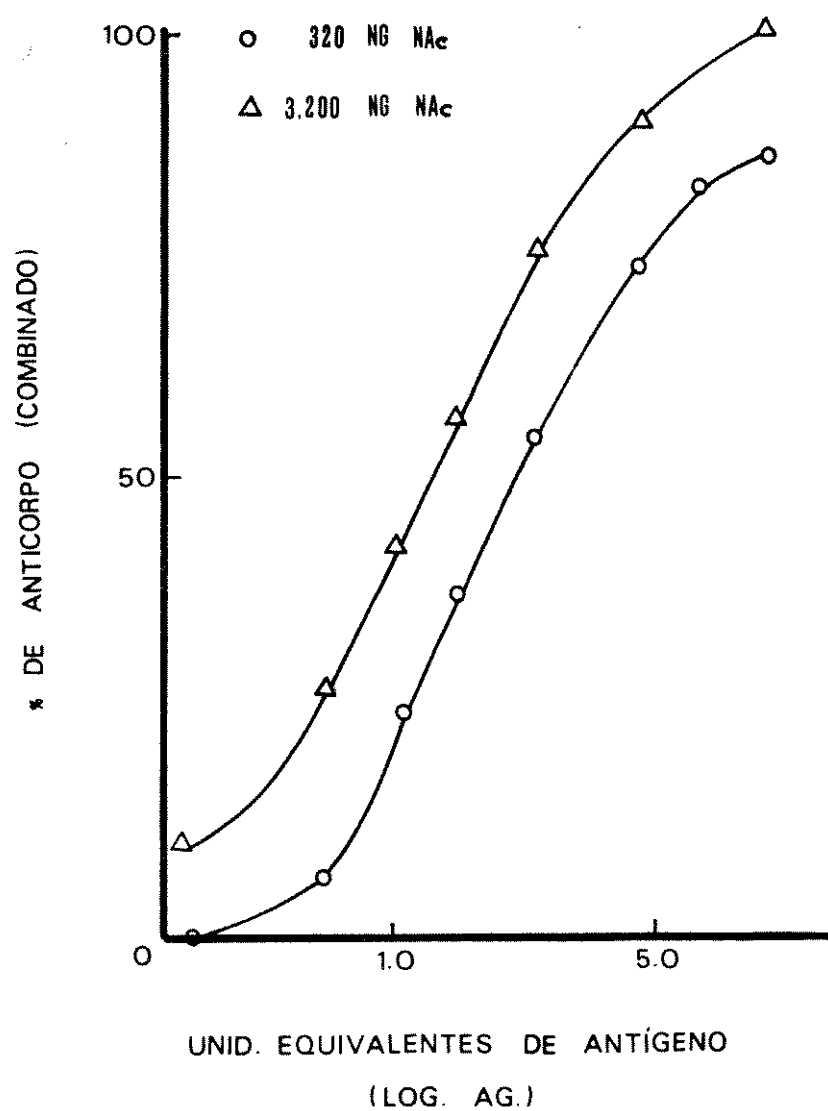


Fig. 2 - Resultado da inibição.

à mesma escala, o anticorpo "combinado" é expresso em "%" dos anticorpos inicialmente presentes e a quantidade de antígeno é expressa em "unidades equivalentes". Uma unidade equivalente é aqui referida como a quantidade de antígeno capaz de precipitar todos os anticorpos presentes em 1 ml de soro não diluído. Consideramos arbitrariamente que 10^{-3} ou 10^{-4} vezes aquela quantidade de antígeno representaria uma unidade equivalente frente ao soro diluído a 10^{-3} ou 10^{-4} respectivamente.

Pode-se verificar na figura 2, que a relação entre o logaritmo da quantidade de antígeno e a proporção de anticorpos "combinados" pode ser representada por uma curva sigmoide, cuja região central, situada entre 0.5 e 1.5 unidades equivalentes é praticamente linear. Observa-se ainda que a proporção de anticorpos "combinados" $Ac(n)$ é significativamente mais elevada nas misturas contendo maior concentração de anticorpos.

DISCUSSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que se pode determinar quantitativamente o conteúdo de Ac de um soro anti-proteína utilizando-se o método de hemólise passiva indireta. A sensibilidade do método depende, sobretudo, da sensibilização das hemácias. A sensibilização máxima à lise específica das Hem.Ag foi sempre obtida quando proporções definidas de reagentes foram empregadas durante a conjugação. Utilizando-se uma suspensão padronizada de hemácias a concentração ótima de BDB e BDF foram respectivamente de 40 μM e 0,2 μM .

O fato de se verificar uma discrepância entre as concentrações de BDB e BDF necessária para a sensibilização das Hem sugere que o BDF é cerca de 200 vezes mais reativo do que a BDB, fato esse provavelmente ligado à estabilização das ligações diazoicas pelo fluoroborato (ROE, A., 1967).

Uma mesma concentração ótima de BDB (40 μM) ou BDF (0,2 μM), foi sempre encontrada independentemente da concentração ou natureza do Ag empregado na sensibilização. Em qualquer circunstância em que as concentrações acima indicadas foram alteradas verificou-se sempre uma menor sensibilidade das hemácias à lise específica.

Este fato pode ser explicado admitindo-se que concentrações do ligante e consequentemente do Ag na superfície das hemácias aquém ou além da ótima, levaria a menor susceptibilidade à lise específica. Esta interpretação encontra apoio nos trabalhos de INGRAHAM, (1952) que mostrou que hemácias contendo uma alta concentração de para-amino arsonato na sua superfície são pouco susceptíveis à lise específica.

O fato de se ter encontrado uma quantidade ótima de Ag variável conforme a natureza desse antígeno, seria de esperar levando-se em conta a provável variação de Ag para Ag do número e natureza de grupos químicos disponíveis para reação com o ligante. Esta variação não pode ser deduzida da composição em amino-ácidos, porquanto, admite-se que nem todos os grupamentos da proteína estejam em uma posição acessível a combinação com o ligante. Os dados referentes a duração da conjugação do SAB e SAE, proteínas que tem aproximadamente a mesma composição de amino-ácido, mostram que no caso de SAB a velocidade de conjugação é extremamente rápida, enquanto no caso de SAE é significativamente mais lenta, o que sugere que diferentes grupos químicos estão envolvidos na conjugação ou que a disponibilidade desses grupos é diferente em um caso e no outro.

Os dados obtidos com a sensibilização de hemácias com a Ov, mostraram que a medida que se aumentava a concentração de Ag na conjugação, o valor de K obtido para essas células assim sensibilizadas decrescia, tendendo aparentemente para um valor assintótico. Este dado sugere provavelmente uma existência de heterogeneidade do sistema Ag-Ac utilizado. Admitindo-se que o Ag esteja contaminado por uma impureza e que o soro anti-Ov contenha também anticorpos contra o contaminante, seria de esperar um alongamento da curva, relacionando quantidade de Ag e valores de K, em razão da superposição dos resultados dos dois sistemas Ag-Ac.

Os dados de KAMINSKI & GRABAR, (1949) mostraram que a maioria das preparações de Ov contem contaminantes altamente imunogênicos e diferentes componentes antigenicamente relacionados a Ov de modo que os soros obtidos pela imunização de coelhos com essas preparações representam uma mistura

de anticorpos com diferentes especificidades.

A natureza do ligante utilizado na fixação do Ag a Hem tem uma nítida influência na capacidade da hemácia lisar especificamente. Nas nossas experiências resultados idênticos foram obtidos utilizando-se quer o BDB ou BDF, o mesmo não acontecendo quando, em experiências não relatadas, foi utilizado o glutaraldeído. As hemácias sensibilizadas, usando-se este último composto, mesmo em condições mitigadas eram resistentes a lise específica, necessitando altas concentrações de anticorpo e C para provocar 100% de lise. Com concentrações maiores desse ligante as hemácias sensibilizadas não mais eram susceptíveis a lise, seja a específica ou seja a lise em presença de água destilada.

As diferenças encontradas entre os ligantes de natureza diazoica e o glutaraldeído se deve muito provavelmente a capacidade desses ligantes reagirem ou não com grupos químicos envolvidos ou muito próximos dos receptores para componentes do complemento presente na superfície da hemácia. Os dois grupos de ligantes reagem com grupamentos químicos diferentes. Os ligantes diazoicos reagem, sobretudo, com radicais tirosina, e menor extensão com a histidina e lisina, enquanto que o glutaraldeído reagem com grupamentos amínicos, principalmente e da lisina.

Desconhece-se a estrutura dos receptores para o complemento existente na superfície das hemácias, de modo que não é possível saber a influência exercida por estes ligantes na estrutura dos receptores.

A possibilidade de que radicais capazes de recombinar com glutaraldeído integrem as estruturas de receptores

para complemento deverá ser investigada, procurando saber que componentes do complemento são bloqueados de se fixarem às hemácias. Os dados relativos a temperatura de conjugação, mostraram que não houve diferença significativa nos valores de K das hemácias sensibilizadas a 0°C ou a 37°C embora tenha havido considerável diferença na resistência a lise e nos valores de h. O fato de ter sido encontrado o mesmo valor de K sugere que aproximadamente o mesmo número de moléculas de Ag capazes de se combinarem com Ac estão presentes nas hemácias sensibilizadas a 0°C e a 37°C.

Esta hipótese está em aparente contradição com o fato conhecido que o aumento da temperatura da reação se traduz pelo aumento da velocidade dessa e portanto, maior número de moléculas de Ag devem se fixar às hemácias, proporcionalmente ao aumento de temperatura. Realmente, experiências com Ag marcado (dados não publicados), mostraram que hemácias sensibilizadas a 37°C contem maior concentração de Ag na sua superfície do que as hemácias sensibilizadas a temperatura inferior. Contudo, um aumento de quantidade de Ag na superfície das hemácias, pode não se traduzir em aumento da sensibilidade à lise, em virtude da possibilidade de ocorrência de impedimento estérico de vários determinantes antigênicos ou do bloqueio, na superfície da hemácia, de receptores para componentes do complemento.

A diferença entre os valores de h dos lotes sensibilizados a 0°C e a 37°C indicam que este último lote apresenta maior resistência à lise específica. Este fato sugere um relativo aumento no envolvimento nos sítos receptores de C a medida que a temperatura e consequentemente a quantidade de Ag fixado à hemácia aumenta. A diminuição da resistência a lise espontânea das hemácias sensibilizadas a 37°C sugere, em

apoio da hipótese anterior, que as alterações provocadas pela maior fixação de Ag à hemácia são profundas não sendo de estranhar, portanto, que nessas condições ocorram danos aos receptores do C.

Utilizando-se hemácias sensibilizadas com o Ag em condições ótimas foi possível titular-se a maioria dos diferentes anticorpos anti-proteínas testados através dos métodos direto e indireto da hemólise passiva.

Os dados obtidos pelo método indireto mostraram estreita correlação entre conteúdo total de anticorpos determinado pelo método de Heidelberger e Kendall, e o título hemolítico.

Utilizando-se um mesmo sistema proteína anti-proteína, as variações dos valores de K foram inferiores a 10%. Comparando-se contudo, os diferentes sistemas anti-proteínas observou-se a existência de diferenças significativas entre as médias obtidas para esses diferentes sistemas, tendo sido de 7,0 ng N Ac/ml para o sistema anti Ov, e 9,0 para os sistemas anti-HF e anti-SAB e de 11,6 para os sistemas SAE e SAH. Essas diferenças se devem provavelmente à variações na resposta imunitária aos diferentes Ag e a variações na afinidade dos anticorpos produzidos contra os diferentes Ag.

O soro anti-SGC utilizado no presente estudo, preparado contra fração IgG purificada do soro normal de coelho, contém muito provavelmente uma mistura em diferentes proporções de anticorpos específicos para as cadeias κ , λ e γ . Desse modo esse soro poderia detectar apenas determinantes antigênicos presentes nestas cadeias que poderiam estar presentes em proporções diferentes nos imune-soros estu-

dados. Esta hipótese parece provável também, visto achados (NUSSENZWEIG, 1964) que mostrou que a proporção de cadeias κ e λ sintetizadas após um estímulo antigênico variam com a natureza do antígeno.

Os dados referentes aos valores de K obtidos através do método direto da hemólise passiva mostram uma ampla variação desses valores entre 25 a 355 ng/N Ac/ml. Estas variações dos valores de K, contrastando com os achados pelo método indireto reflete indubitavelmente as diferenças de mecanismo de lise nos dois métodos. Enquanto no método direto a lise é estreitamente dependente da natureza dos Ac combinado com o antígeno fixado à superfície da hemácia, no método indireto a lise independe da natureza desses anticorpos, que nesse caso exerce a dupla função de Ac e Ag (RANGEL, 1968).

Merece destaque o fato de ter sido possível detectar a presença de anticorpos no soro anti-B(I) através do método indireto ao passo que não foi possível detectar esses anticorpos já pelo método direto já pelo método da precipitação específica. Este soro foi preparado por imunizações de coelho, com fragmento da SAB isolado nesse laboratório. O teste hemolítico foi realizado com hemácias sensibilizadas com SAB e a especificidade da reação foi confirmada através da inibição da reação pelo SAB. Nos testes hemolíticos este soro foi capaz de fornecer 50% de lise quando diluído a 1:50 o que daria uma concentração de 450 Ng/N Ac/ml admitindo-se para este sistema o mesmo valor médio de $K = 9$ ng N Ac/ml encontrado para o sistema anti-SAB. Esta concentração de anticorpos não poderia ser detectada através do método de precipitação, cujo limite de sensibilidade se situa entre (20 μ g de N Ac \pm 10%) mas poderia teoricamente

ser detectada pelo método direto. A impossibilidade de se detectar estes anticorpos pelo método direto se deve portanto, a incapacidade básica do sistema Anti-B(I) x BSA para fixar C. De fato as experiências controle mostraram que este sistema não fixa C.

A comparação dos dados da curva de precipitação com os obtidos pela inibição da hemólise passiva indireta (HPI), mostram aparente discrepância. De fato, desprezando as diferenças evidentes entre estes dois métodos, seria de esperar que 32 ng N/Ag fosse capaz de se combinar com 320 ng/N Ac/ml existente no sistema, inibindo totalmente a lise, porquanto, no teste de precipitação 32 µg/N Ag foram capazes de precipitar todos os anticorpos presentes no soro (320 µg N/Ac). Considerando-se no entanto as diferenças fundamentais entre as duas técnicas, as discrepâncias observadas podem ser facilmente explicáveis.

Diferentemente do sistema precipitante na HPI deve-se considerar que as moléculas de anticorpos deverão se combinar com moléculas de Ag fixadas à hemácia (Hem.Ag) e com moléculas de Ag em solução. Admitindo-se que a afinidade dos anticorpos por Hem.Ag e por Ag sejam iguais, apenas uma parte dos anticorpos, proporcional a relação Ag/Hem.Ag, se fixará na superfície da hemácia e conseqüentemente será detectada pelos soros anti-SGC. Ademais, deve-se levar em conta que nos sistemas de HPI o Ac acha-se altamente diluído e que os complexos Ag-Ac solúveis podem interagir, com a Hem.Ag. Esta possibilidade é fortemente sugerida pelo aumento dos valores de h quando quantidades superiores a 1 unidade equivalente são utilizados no sistema.

O conjunto de dados obtidos no presente trabalho, mos

tra que é possível titular-se antígenos e anticorpos utilizando-se o fenômeno da hemólise específica passiva indireta com a sensibilidade e segurança maior do que os métodos clássicos de dosagem por fixação de C. Enquanto esses métodos são capazes de detectar 120 ng N/Ac, os métodos de hemólise passiva indireta foram capazes de detectar de 7 a 12 ng N/Ac/ml ou seja, uma sensibilidade 10 vezes maior. Ademais através do método da hemólise passiva indireta é possível detectar anticorpos que não fixam C e consequentemente não podem ser detectados através de técnicas clássicas. Por outro lado, o fato de que os Ac são titulados através dos seus determinantes antigênicos abre-se a perspectiva de, usando-se soros anti-SGC específicos para determinadas cadeias polipeptídicas dessas imuno-globulinas, detectar-se quantitativamente diferentes classes ou sub-classes das imuno-globulinas envolvidas em determinada reação Ag-Ac.

O uso de radicais azoicos para estabelecer ligações covalentes entre o Ag e a Hem ou a suportes insolúveis e largamente difundidos (LANDSTEINER, 1945; GYENER & SEHON, 1964). Contudo, os ligantes diazoicos apresentam o inconveniente da sua alta instabilidade o que torna aleatória a obtenção de conjugados padronizados.

Seria altamente desejável a obtenção de ligantes estáveis com a mesma reatividade dos diazoicos, que praticamente não interferem nem na reatividade imunológica dos Ag nem na susceptibilidade das hemácias à lise específica.

Os nossos dados obtidos no presente trabalho mostram que o BDF composto constituído pela benzidina-bis-diazotada cujos radicais acham-se estabilizados pela ação do fluoroborato, tem todas as vantagens dos reagentes diazoicos sem a desvantagem da sua instabilidade.

RESUMO E CONCLUSÕES

O método da hemólise passiva indireta foi utilizado, para titular diferentes anticorpos anti-proteína. Os antígenos foram ligados covalentemente à hemácia, utilizando-se a benzidina bis-diazotada (BDB) ou 4'4' bi-fenil-bis-diazonio-fluoroborato (BDF). Os dados obtidos mostraram que:

1) o BDF - composto bi-funcional estável - além de possuir as mesmas vantagens da BDB, supera-a quanto a estabilidade;

2) o método da hemólise passiva indireta é capaz de detectar entre 7 a 12 ng NAc/ml; sendo cerca de 13 vezes mais sensível do que os métodos de fixação do C ou da hemólise passiva direta;

3) este método pode ser empregado para detectar anticorpos que não precipitam ou que não fixam complemento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, F.L. On hemolysis mediated by non-Erythrocytic antigens, their homologous antibodies and complement. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 74:561-565, 1950.
- ALMEIDA, J.O & AZEVEDO, M.P. Estudos sobre hemólise condicionada. I. Relações quantitativas entre os elementos da reação de hemólise condicionada no sistema tuberculose. Rev.Bras.Biol., 12:129-150, 1952.
- BIER, O.G. Observations preliminaires sur l'hémagglutination l'hémolyse et la congglutination "Passives". Ann.Inst. Pasteur, 81:650-656, 1951.
- BIER, O.G.; SIQUEIRA, M. and SATUB, A.M. Quantitative studies on passive hemolysis with special reference to the relationship between the hemolytic activity of antibody and its complement fixing ability. Int.Arch. Allergy Appl.Immunol., 9:93-101, 1956.
- BLOCK, K.J.; KOURIS, F.M.; OVARY, Z. and BENACERRAF, B. Properties of guinea pig 7S antibodies. III. Identification of antibodies involved in complement fixation and hemolysis. J.Exp.Med., 117:965-981, 1963.
- BORDUAS, A.G. & GRAEAR, P. L'hémagglutination passive dans la recherche des anticorps antiproteïniques. Ann.Inst. Pasteur, 84:903-910, 1953.
- BORSOS, T. & RAPP, H.J. Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. Science, 150: 505-506, 1965.

- BOYDEN, S.V. The absorption of proteins on erythrocytes triated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J.Exp.Med., 93:107-120, 1951.
- BUTLER, W.T. Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. Effect of bis-diazo-benzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. J. Immunol., 90:663-671, 1963.
- ESTEVEES, M.B.; SANT'ANNA, O.A.; ANNES, V.C.S. and BINAGHI, R. Characterization and properties of an anaphilatic 7S antibody in sheep. J.Immunol., 112(2):722-727, 1974.
- FEINBERG, R.J. & WRIGHT, G.G. Hemagglutination by tularemia antisera and its inhibition by polysaccharide. Fed. Proc., 10:407-408, 1951.
- FISHER, S. & KEOGH, E.V. Lysis by complement of erythrocytes which have adsorbed a bacterial component and its antibody. Nature, 165:248, 1950.
- FISHER, S. The estimation in vitro of small amounts of diphteria antitoxin by means of a haemagglutination technique. J.Hyg., 5:445-455, 1952.
- FRIEDWALD, W.F. The immunological response to influenza virus infection as measured by the complement fixation test. J.Exp.Med., 78:347-366, 1943.
- GOLD, E.R. & FUDENBERG, H.H. Chromic chloride: A coupling reagent for passive hemagglutination reactions. J.Immunol., 99:859-866, 1967.

- GYENES, L. & SEHON, A.H. The use of tolylene-2,4-diisocyanate as a coupling reagent in the passive hemagglutination reaction. Immunochemistry, 1:43-48, 1964.
- HAMMERLING, U & WETPHAL, O. Synthesis and use of O-stearoyl polysaccharides in passive hemagglutination and hemolysis. Eur.J.Biochem., 1:46-50, 1967.
- HUMPHREY, J.H. Haemolytic Efficiency of Rabbit IgG anti-Farssman antibody and its augmentation by anti-rabbit IgG. Nature, 216:1295-1996, 1967.
- JOHNSON, H.M.; BRENNER, K. and HALL, H.E. The use of a water-soluble carbodhimide as coupling reagent in the passive hemagglutination test. J.Immunol., 97:791-796, 1966.
- INGRAHAM, J.S. Specific complment dependent hemolysis of sheep erythrocytes by anti-serum to azo hapten groups. J.Infect.Dis., 91:268-275, 1952.
- KABAT, E. & MAYER, M. Experimental Immunochemistry. Springfield, Thomas, 1961.
- KAMINSKA, M. & GRABAR, P. Étude immunochimique comparée de l'ovalbumine de poule et al plaqualbumine. Bull.Soc. Chim.Biol., 31:684-688, 1949.
- KENT, J.F.; BUKANTZ, S.C. and REIN, C.R. Studies in complement fixation. I. Spectrophotometric titration of complement; construction of graphs for direct determination of the 50 per cent hemolytic unit. J.Immunol., 53:31-42, 1946.

- LING, N.R. The coupling of protein antigens to erythrocytes with difluoridinitrobenzene. Immunology, 4:49-54, 1961.
- MALTANER, F. & MALTANER, E. The quantitative determination of antigen-antibody reaction by complement fixation. In: INTERNATIONAL CONGRESS MICROBIOLOGY, 3, N.York, 1939. Report Proc. New York, 1939. p. 781-790.
- MALTANER, E. & GNESH, G.M. 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, 1948.
- MAYER, M.M.; EATON, B.B. and HEIDELBERGER, M. Spectrophotometric standartization of complement for fixation testes. J.Immunol., 53:31-35, 1946.
- MAYER, M.M.; OSLER, A.G.; BIER, O.G. and HEIDELBERGER, M. Quantitative studies of complement fixation. I. A method. J.Immunol., 59:195-206, 1948.
- MELAND, J.A. Antibodies in human sera against antigens in gonococci, demonstrated by a passive hemolysis test. Acta.Pathol.Microbiol.Scand., 67:102-110, 1966.
- MIDDLEBROOK, G. & DUBOS, R.J. Specific serum agglutination of erythrocytes rensitized neith extracts of tubercle bacilli. J.Exper.Med., 38:521-527, 1948.
- MIDDLEBROOK, G. A hemolytic modification of the hemagglutination test for antibodies against tubercle bacillus antigens. J.Clin.Immunol., 29:1480-1485, 1950.
- MUNIZ, J. Comportamento da hemácias sensibilizadas com a

fração polissacarídeo do Schizotrypanum cruzi quando em presença de soros específicos. "Hemólise condicionada" um caso particular dentro das reações de imunidade. Hospital, 37:55-61, 1950.

NUSSENZWEIG, R.S.; MERRYMAN, C.; BENACERRAF, B. Electro-phoretic separation and properties of mouse antihapten antibodies involved in passive cutaneous anaphylaxis and passive hemolysis. J.Exper.Med., 120:315-328, 1964.

ONKELINX, E.; MEULDERMANS, W.; JONIAU, M. and LONTIE, R. Glutaraldehyde as coupling reagent in passive hemagglutination. Immunology, 16:35-43, 1969.

OSLER, A.G. Quantitative studies of complement fixation. Bacteriol.Rev., 22:246-266, 1958.

PECK, J.L. & THOMAS, L. Studies on the hemolysis of human erythrocytes by homologous complement in the presence of tannic acid. Bull.Jahns.Hopk.Hosp., 84:216-237, 1949.

PRESSAMAN, D.; CAMPBELL, D.H. and PAULING, L. The agglutination of intact azo-erythrocytes by antisera homologous to the attached groups. J.Immunol., 44:101-105, 1942.

RANGEL, H. Study of the cross - reaction between rabbit anti-bovine serum albumin antibodies and equine serum albumin. Immunology, 8:88-94, 1965.

RANGEL, H. & REPKA, D. The use of passive hemolysis in the quantitative estimation of anti-protein-antibodies. Immunology, 8:618-627, 1965.

- RANGEL, H. Studies on passive haemolysis mediated by anti-serum globulin antibodies. Immunology, 14:197-211, 1968.
- ROE, A. Preparation of aromatic fluorine compounds from diazonium fluoroborates. The Schiemann reaction. In: ADAMS, R., ed. Organic reaction. New York, John Wiley, 1967. v. 5, cap. 4, p. 205-206.
- SANDEBERG, A.L.; OSLER, A.G.; SHIN, H.S. and OLIVEIRA, B. The biologic activities of guinea pig antibodies. II. Modes of complement interaction with $\gamma 1$ and $\gamma 2$ immunoglobulins. J.Immunol., 104:329-334, 1970.
- SILVESTEIN, A.M. & MALTANER, F. Hemolysis with complement of intact azo-erythrocytes sensitized with anti-sera homologous to the attached azo-grouping. J.Immunol., 69:197-200, 1952.
- STAVITSKY, A.B. & ARQUILLA, E.R. Studies of proteins and antibodies by specific hemagglutination and hemolysis of protein-conjugated erythrocytes. Int.Arch.Allergy Appl. Immunol., 13:1-38, 1958.
- STAVITSKY, A.B. Micromethods for the study of proteins and antibodies. II. Specific applications of hemagglutination and hemagglutination-Inhibition. Reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. J.Immunol., 72: 368-375, 1954.
- STEIN; G.J. & VAN NGU, D. A quantitative complement fixation test: titration of luetic sera by the unit of 50 per cent hemolysis. J.Immunol., 65:17-37, 1950.

VON KROGH, M. Colloidal chemistry and immunology. J.Infect. Dis., 19:452-460, 1916.

WADSWORTH, A.; MALTANER, E. and MALTANER, F. The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. J.Immunol., 21:313-340, 1931.

WADSWORTH, A.; MALTANER, F. and MALTANER, E. Quantitative studies of the complement fixation reaction with syphilitic serum and tissue extract. Technic of the practical quantitative test. J.Immunol., 35: 217-234, 1938.

WASSERMAN, E. & LEVINE, L. Quantitative micro-complement fixation and its use in the study of antigenic structure by specific antigen-antibody inhibition. J.Immunol., 87: 290-295, 1961.