

## OBTENÇÃO, PREPARO E PADRONIZAÇÃO DE UMA HEMOLISINA ANTI-HOMEM \*

Maria Aparecida de Araújo Arantes\*\*

---

### RESUMO

Um novo método para preparação de hemolisina foi proposto - Hemolisina anti-homem. Assim, quando inoculamos em jumentos uma suspensão de glóbulos humanos do grupo A podemos obter um soro hemolítico anti-homem.

A hemolisina preparada conforme as especificações que se seguem tem capacidade de sensibilizar hemácias homólogas.

Nas reações de fixação de complemento as hemácias desempenham um duplo papel: funcionam como antígeno, para a produção de hemolisina e como indicadoras de complemento livre nas reações propriamente ditas, quando sensibilizadas pela hemolisina.

---

### INTRODUÇÃO

O diagnóstico sorológico de várias doenças em sua forma crônica tem sido feito por reação de fixação de complemento. Entretanto, a complexidade dessa reação tem criado uma série de dificuldades para adoção do método da rotina sorológica de laboratório.

Visando a simplificar este método, obviamente, nossas atenções

iniciais foram dirigidas para um sistema hemolítico que aproveitasse a matéria prima peculiar e fácil de ser obtida nos próprios laboratórios, ou seja, o sangue humano.

Reverendo a literatura a respeito, encontramos a primeira menção sobre o uso de glóbulos humanos em sistema hemolítico feita por Tschernogubow em 1909(10). Segundo esse autor, a fração globulínica e os lípidos seriam destituídos da capaci-

---

\* Resumo de um capítulo de Tese de Doutorado apresentada pela autora à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de S. Paulo para obtenção do grau de Doutor.

\*\* Professor Assistente Doutor do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

dade de estimular, em coelhos, a produção de hemolisina anti-homem. No ano seguinte, Dungern & Hirschfeld<sup>(3)</sup> usaram glóbulos humanos na reação de Wassermann, da mesma forma que o fizeram Noguchi & Bronfenbrenner<sup>(6)</sup> e novamente Noguchi<sup>(7, 8)</sup>.

A pouca antigenicidade dos glóbulos humanos, quando inoculados em mamíferos, era o maior obstáculo para obter-se hemolisina anti-homem com título suficientemente alto. A partir dessas informações, diversas experiências foram realizadas em diferentes animais que culminaram com a obtenção de uma hemolisina anti-homem com título suficientemente adequado para ser usado em rotina sorológica.

#### MATERIAL E MÉTODO SUSPENSÃO DE GLÓBULOS HUMANOS

Após ensaios preliminares com suspensão de glóbulos humanos dos diversos grupos sangüíneos, foram escolhidas as do grupo A colhidas em solução de Alsever, por ser a mais adequada. Podemos usar também como matéria-prima justamente aquele material inútil - sangue de doador inadequado - cujo destino habitual seria a pia de despejo, e até mesmo coágulos.

A tipagem foi feita em lâmina.

#### OBTENÇÃO E PREPARO DA HEMOLISINA ANTI-HOMEM

Para se obter hemolisina anti-homem, vários animais foram inoculados por 2 métodos: pela técnica clássica descrita por Ulrich e Mc Arthur<sup>(11)</sup> em que se inoculavam soro humano e hemácias sucessivamente; ou apenas pela inoculação de uma suspensão de hemácias humanas do grupo A diluídas em solu-

ção fisiológica (método improvisado).

A via de inoculação e a quantidade de inóculo variaram conforme o animal. Ao material a ser inoculado acrescentavam-se 400.000 unidades de penicilina e 0,5 g de estreptomicina.

A sangria foi feita por punção cardíaca nos animais de pequeno porte e na veia jugular dos maiores, sempre no 5o. dia após a última inoculação. O sangue foi colhido asépticamente, o mesmo ocorrendo com a separação do soro, que foi conservado em Timerosal na proporção de 1/5.000, Powell<sup>(9)</sup> e guardado em geladeira. Nessas condições o seu título vem se mantendo inalterado por alguns anos.

Cronologicamente foram experimentados os seguintes animais:

#### 1) COELHOS:

a) Pela técnica de Ulrich e Mc Arthur<sup>(11)</sup>

b) Por uma técnica improvisada  
Tentou-se inicialmente o preparo do soro hemolítico, segundo a tradição, em coelho. Esse animal revelou-se inadequado porque não só produzia hemolisina de baixo título, como também de alto poder aglutinante e a aglutinação diminuiu o poder sensibilizante. Título obtido 1/20.

#### 2) COBAIAS:

a) inoculadas, segundo Noguchi e Bronfenbrenner<sup>(6)</sup>

b) por uma técnica improvisada  
Obtivemos um baixo rendimento em soro hemolítico como também uma hemolisina de baixo título (1/20).

#### 3) CAVALO:

a) Usamos uma técnica improvisada

b) Mistura de várias técnicas padronizadas. Título obtido 1/40.

#### 4) MULA:

Usamos uma mistura de várias técnicas e obtivemos hemolisina com baixo título.

#### 5) JUMENTO:

O jumento foi o animal que mais se prestou às imunizações, demonstrando ser capaz de produzir anticorpos específicos contra glóbulos humanos do tipo amboceptor sensibilizante e sem aquele inconveniente de facilitar a aglutinação que interferiria na sensibilização dos glóbulos.

#### ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Dois animais foram inoculados com suspensão de hemácias do grupo A a 50%, de 7 em 7 dias.

As duas primeiras inoculações foram por via endovenosa (veia jugular) com 50 e 100 ml respectivamente. Essa última dose provocou morte de um animal e "shock" em outro. Decorridos 10 dias, no sobrevivente usou-se a via subcutânea; sendo injetadas 20, 50 e 100 ml da suspensão de hemácias a 50%, de 7 em 7 dias.

Uma sangria de prova foi feita, e a definitiva 5 dias após a última inoculação.

Foram obtidos 3 litros de sangue cujo soro (1 litro) foi separado por centrifugação e inativado a 56°C em banho-maria durante 30 minutos. Depois dividido em porções de 2,0 ml que foram guardados em geladeira.

Obtivemos uma hemolisina com título 1/80.

#### DOSAGEM DE HEMOLISINA ANTI-HOMEM

#### TÉCNICA

1. Prepara-se uma estante com 2 séries de tubos numerados de 1 a 7.

2. No primeiro tubo da 1a. série coloca-se 0,2 ml do soro hemolítico e 1,8 ml da solução fisiológica tamponada (solução salina boratada). Wadsworth (12). Nos demais 1,0 ml de solução salina boratada.

3. Transfere-se 1,0 ml do 1o. tubo para o 2o. tubo, mistura-se bem e passa-se 1,0 ml do 2o. para o 3o. e assim por diante até o 7o. tubo do qual se retira 1,0 ml, que é desprezado.

4. Em todos os tubos da 2a. série coloca-se 1,0 ml de hemácias humanas diluídas a 5%.

5. Verte-se a diluição de hemolisina no tubo correspondente, contendo hemácias, mistura-se bem por passagens sucessivas de um tubo para outro. Proceda-se desta forma com os demais tubos da série.

Assim as hemácias estarão sensibilizadas com quantidades diferentes de hemolisina. Ligeira aglutinação nos tubos onde houver mais hemolisina poderá ocorrer, não constituindo no entanto nenhum inconveniente.

As diluições finais de hemolisina serão: 1/10 - 1/20 - 1/40 - 1/80 - 1/160 - 1/320 - 1/640.

#### PREPARO DAS DILUIÇÕES DE COMPLEMENTO

Dilui-se 0,1 ml de complemento de coabaia em 5,9 ml de solução salina boratada (diluição 1/60) e deixa-se um frasco imerso em gelo fundente. A partir dessa diluição preparam-se outras que terão as seguintes concentrações finais: 1/67 - 1/88,5 - 1/111 - 1/137 - 1/176 - 1/231 e 1/300.

Proceda-se à dosagem da hemolisina de acordo com Almeida (1 e 2).

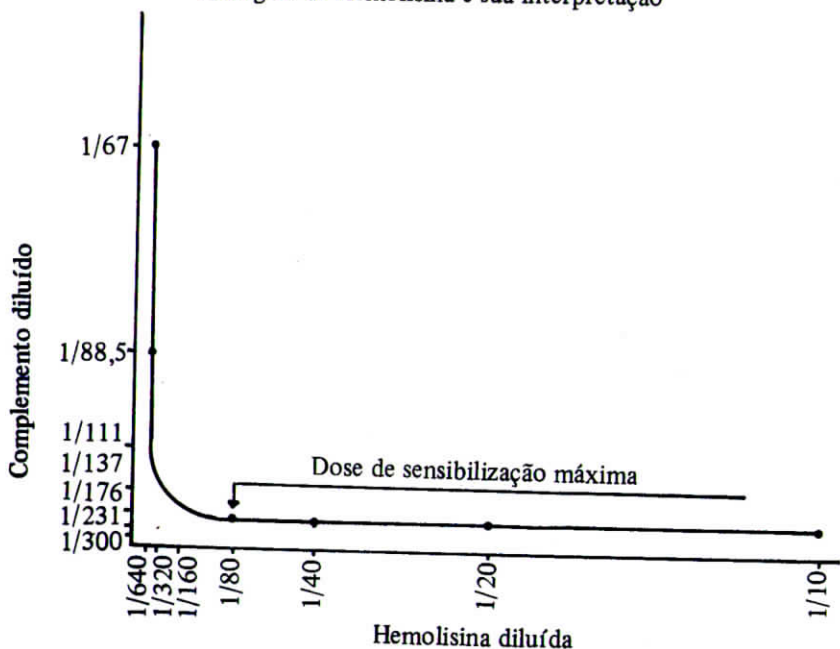
## INTERPRETAÇÃO DA DOSAGEM DA HEMOLISINA ANTI-HOMEM

Avaliando-se a intensidade de hemólise no sentido das concentrações crescentes de hemolisina (gráfico abaixo) nota-se que a partir da diluição 1/80 ela permanece inalterada; maiores quantidades de hemolisina não aumentaram a sensibilida-

de das hemácias à ação hemolítica do complemento. Esta é a "dose de sensibilização máxima", Almeida(2).

Nas reações usamos duas doses de sensibilização máxima para aumentar a avidéz das hemácias pelo complemento, Kent(4 e 5), porque hemácias, quando sensibilizadas ao máximo, são capazes de evidenciar quantidades mínimas de complemento.

GRÁFICO  
SISTEMA HEMOLÍTICO ANTI-HOMEM  
Dosagem de Hemolisina e sua interpretação



Relação entre as quantidades de complemento e de hemolisina necessárias para 50% de hemólise.

Foram projetados em gráfico pontos correspondentes a 50% de hemólise. Estes pontos ligados por uma linha contínua formam uma

curva na qual se distingue 3 zonas:  
a) Porção paralela ao eixo das ordenadas que corresponde à zona de sensibilização parcial, ou falta de

hemólise onde o excesso de complemento compensa a falta de hemolisina.

b) Porção paralela ao eixo das abscissas, que corresponde à **zona de sensibilização máxima**, onde ocorreu o mesmo grau de hemólise com quantidades crescentes de hemolisina.

c) Porção intermediária da curva, que corresponde à **zona de suplência**, onde a falta de hemolisina é compensada pelo excesso de complemento.

### CONCLUSÕES

Do exposto podemos concluir que é possível se obter um soro hemolítico anti-homem preparado em jumento que poderá substituir o soro hemolítico anti-carneiro.

A conjugação desse soro hemolítico com hemácias humanas do grupo A forma um sistema hemolítico capaz de detectar complemento livre.

A introdução de um novo sistema indicador hemolítico - o sistema anti-homem em reações de fixação de complemento, poderá simplificar o método e torná-lo mais exequível, mais barato e mais fácil de ser usado em laboratórios de rotina.

### SUMMARY

Type A- human cells can be used for the inoculation of mules, in the preparation of the specific amboceptor, but also in the complement fixation test.

Since it is possible to use the antihuman hemolytic system.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.O., Nota sobre a fórmula da equação de von Krogh, rela-

cionando tempo de hemólise e concentração do amboceptor. Rev. Brasil. Biol. 10: 347 - 351, 1950.

2. \_\_\_\_\_ Contribuição para o estudo das reações quantitativas de fixação de complemento. I.O. sistema hemolítico. Tese da Fac. de Medicina da Universidade de S. Paulo. Mimeografado. 1950.
3. DUNGERN & HIRSCHFELD, Ueber unsure modification de Wassermanchen Reaktion. Ann. Med. Wochenschr., LVII: 1124, 1910.
4. KENT, J.F., An abbreviated spectrophotometric technique for determining the optimal concentration of amboceptor. J. Lab. Clin. Med., 31 (11): 1270 - 1277, 1946.
5. \_\_\_\_\_ A quantitative study of the complement-hemolysin relation. Science, 105: 316 - 317, 1947.
6. NOGUCHI, H. & BRONFENBRENNER, J., The comparative merits of various complement and amboceptors in the serum diagnosis of syphilis. J. Exp. Med., 13: 78 - 97, 1911.
7. NOGUCHI, H., A hemohemolytic system for the serum diagnosis of syphilis. J. Exp. Med., 18: 43 - 67, 1918.
8. \_\_\_\_\_ Laboratory diagnosis of syphilis, pg. 63, New York, Paul B. Hoeber in 392, pg., 1923.
9. POWELL, H.M. & Janielson, W.A., Merthiolate as germicide. An. J. Hyg., 13:396 - 410, 1931.
10. Tschernogubow, N.A., Ein vereinfachtes verfahren der serum diagnosis Syphilis. Deutsch. Med. Woch., 35: 688, 1909.
11. ULRICH, C.A. & MC ARTHUR, F.X., An improved method for the production of antisheep hemolysin. An. J. Clin. Path. Tech. Sec., 12: 84 - 85, 1942.
12. WADSWORTH, A.B. Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. Williams & Wilkins ed. p. 261 - 454, 1947.