

REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO PARA CISTICERCOSE NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO. EMPRÉGO DE NOVO ANTÍGENO POR MÉTODO QUANTITATIVO

ALVARO E. DE ALMEIDA MAGALHÃES *

Desde a introdução da reação de fixação do complemento para diagnóstico da cisticercose cerebral, por Moses ³, em 1911, o seu valor vem sendo salientado por vários autores que têm estudado o assunto ^{3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11}. Embora os antígenos de cisticercose tenham sido preparados por diversos métodos, a ocorrência relativamente freqüente de reações inespecíficas não tem sido evitada, principalmente em casos de neurosífilis ^{7, 11}. Ainda recentemente Nieto ⁶, usando antígeno de *Cysticercus cellulosae*, previamente tratado pela acetona, verificou positividade da reação para cisticercose em cerca de 30% dos casos com líquido cefalorraquidiano com reação de Wassermann positiva.

No presente trabalho estudamos a reação de fixação do complemento para cisticercose no líquido cefalorraquidiano usando um novo antígeno, por método quantitativo; os resultados, obtidos em grupos bem definidos de pacientes, mostraram ser o método dotado de sensibilidade e especificidade, mesmo em casos de neurosífilis.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno — O antígeno é um extrato metílico de *Cysticercus cellulosae* desengordurado pelo benzeno. O tratamento pelo benzeno, empregado também por Freitas e Almeida ² no preparo de antígeno de *T. cruzi*, tem sido indicado em vários sistemas, na extração de substâncias não responsáveis pela especificidade antigênica.

Preparo do antígeno — 1) Retirar cuidadosamente as vesículas de *Cysticercus cellulosae* da carne de porco infestado; 2) lavar as vesículas (inte-

Trabalho do Departamento de Parasitologia (Diretor: Prof. Mauro Pereira Barreto) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (São Paulo). Apresentado ao Centro Médico de Ribeirão Preto em 16 abril 1957.

* Instrutor.

gras e rompidas) várias vezes em solução fisiológica; 3) secar em papel de filtro; 4) adicionar um volume de benzeno igual a 3 vezes o volume de cisticercos; 5) fazer a extração dos cisticercos com benzeno durante 24 horas em temperatura ambiente, agitando várias vezes e separando-os por tamização (repetir duas vezes este processo de extração com intervalo de 24 horas); 6) lavar várias vezes os cisticercos sobre o tamis com benzeno; 7) secar em estufa a 37°C durante 6 horas e completar a secagem no vácuo, em temperatura ambiente; 8) triturar os cisticercos em gral; 9) extrair o pó em álcool metílico absoluto, na proporção de 1 g do pó para 20 ml de álcool. Agitar durante uma hora e deixar que a extração se realize durante 25 dias em temperatura ambiente; 10) centrifugar à temperatura de 3°C-6°C a cerca de 10.000 gravidades durante 15 minutos; 11) o sobrenadante é o antígeno que será conservado em geladeira a 4°C-6°C.

Líquido cefalorraquidiano * — Os líquidos cefalorraquidianos estudados foram obtidos de pacientes com cisticercose cerebral, parasitológicamente comprovada (grupo I); de pacientes sem distúrbios neurológicos e com líquidos sem alterações (grupo II); de pacientes com distúrbios neurológicos e líquidos com ou sem alterações (grupo III); de pacientes com reação de Wassermann positiva no líquido (grupo IV). Estes líquidos cefalorraquidianos satisfizeram as seguintes exigências: aparência límpida, ausência de hemoglobina e ausência de pus. Centrifugados eram mantidos em geladeira a 4°C-6°C. Quando necessário eram conservados congelados a -20°C.

A reação — A reação de fixação do complemento foi feita pelo método de Wadsworth, Maltaner e Maltaner¹⁴. As relações quantitativas entre antígeno, anticorpos do líquido e complemento foram determinadas pelo método da isofixação¹.

Curvas iso-hemolíticas¹³ foram levantadas projetando as quantidades de antígeno (em abscissas) contra as quantidades de líquido cefalorraquidiano (em ordenadas) necessárias para formar complexos antígeno-anticorpo que deixam livre, após a fixação, uma unidade de complemento. As curvas foram traçadas com 3 e 6 unidades de complemento e puderam ser classificadas como do tipo 1^{1a}. Nesse caso, doses de antígeno podem ser usadas desde que estejam afastadas da zona onde antígeno e anticorpo são suplementares. Por conveniência foi empregada uma “dose de reatividade paralela”^{1b}.

A reação é feita de acordo com o quadro 1.

* Os líquidos cefalorraquidianos do grupo I nos foram enviados pelos Drs. Oswaldo Lange e Antonio Spina-França (6 casos) e pelos Drs. João Baptista dos Reis e Aloysio Mattos Pimenta (4 casos); os dos grupos II e III nos foram enviados pela Clínica Neurológica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Prof. Paulo Pinto Pupo); os do grupo IV são provenientes do Hospital Psiquiátrico “Santa Teresa” de Ribeirão Preto, dirigido pelo Dr. Luiz Pinto de Toledo (26 casos) e da Clínica Neurológica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (3 casos). As reações de Wassermann, pela técnica quantitativa de WMM, foram realizadas no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Prof. José de Oliveira Almeida).

| Liquor ml | Antígeno ml | Complemento | | | Solução fisiológica ml | Incubação de 90 minutos em banho-maria a 37°C | Hemácias sensibilizadas ml | Incubação de 15 minutos em banho-maria a 37°C | Solução fisiológica ml |
|--------------|----------------|-------------|-----------|-----------|------------------------------|---|-------------------------------|---|------------------------------|
| | | 1 u ml | 2 u ml | 3 u ml | | | | | |
| 0,2 | 0,1 | | | 0,1 | | | | | 0,4 |
| 0,2 | | 0,1 | | | 0,1 | | | | 0,4 |
| 0,2 | | | 0,1 | | 0,1 | | | | 0,4 |
| | 0,1 | 0,1 | | | 0,2 | | | | 0,4 |
| | 0,1 | | 0,1 | | 0,2 | | | | 0,4 |
| | | 0,1 | | | 0,3 | | | | 0,4 |
| | | | 0,1 | | 0,3 | | | | 0,4 |
| | 0,1 | | | | 0,3 | | | | 0,4 |
| | | | | | 0,4 | | | | 0,4 |

Quadro 1 — Reação de fixação do complemento pelo método de Wadsworth, Maltaner e Maltaner, com antígeno de *Cysticercus cellulosae*. Em cada série de reações é incluído, para controle, um líquido cefalorraquidiano reconhecidamente positivo. Após a última adição de solução fisiológica os tubos são centrifugados, sendo a percentagem de hemólise lida fotométricamente no sobrenadante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão condensados no quadro 2.

| Líquidos cefalorraquidianos de pacientes | Resultados | | Total |
|---|------------|--------------|-------|
| | Reagente* | Não reagente | |
| Sem distúrbios neurológicos (grupo II) | 0 | 31 | 31 |
| Com distúrbios neurológicos (grupo III) | 5 | 108 | 113 |
| Com reação de Wassermann positiva no LCR (grupo IV) | 2 | 27 | 29 |
| Com cisticercose cerebral (grupo I)** .. | 10 | 0 | 10 |

Quadro 2 — Resultados obtidos em reação de fixação do complemento com antígeno de *Cysticercus cellulosae*, em testes com 3 unidades de complemento. * Hemólise de 90%, ou menos, define um líquido "reagente" desde que o controle mostre ser destituído de poder anticomplementar. ** Casos com verificação cirúrgica ou necroscópica.

A sensibilidade da reação com o novo antígeno foi testada em 10 casos, parasitológicamente comprovados (grupo I), com cisticercos no cérebro. A

reação de fixação do complemento para cisticercos foi positiva nos 10 casos (quadro 2).

A inespecificidade do antígeno foi testada, inicialmente, em 31 pacientes sem distúrbios neurológicos e com líquidos cefalorraquidianos sem alterações (grupo II). A reação de fixação de complemento para cisticercose foi negativa nos 31 pacientes.

A inespecificidade do antígeno foi ainda estudada em 142 líquidos cefalorraquidianos de pacientes, presumivelmente não parasitados por *Cysticercus cellulosae*. Estes pacientes foram divididos em dois grupos: grupo III constituído de pacientes com distúrbios neurológicos e apresentando líquidos com ou sem alterações; grupo IV constituído de pacientes em que a reação de Wassermann, pela técnica quantitativa de Wadsworth, Maltaner e Maltaner, foi positiva no líquor.

O grupo III é constituído de 113 casos que, numa catalogação genérica, podem ser assim distribuídos: síndromes convulsivas (66 casos); síndromes de hipertensão intracraniana (4); distúrbios circulatórios cerebrais (8); síndrome de Parkinson (1); síndromes medulares (8); polineurites (5); neurites (8); meningites (2); neurosífilis (5); miopatias (2); tumores cerebrais (1); encefalopatias infantis (2); acidentes cerebrais traumáticos (1). Neste grupo a reação de fixação do complemento para cisticercose foi negativa em 108 casos e positiva em 5 casos que figuram na relação acima com os diagnósticos de síndromes de hipertensão intracraniana (3) e síndromes convulsivas (2).

Analisando com mais detalhe as observações clínicas destes 5 pacientes com reação positiva para cisticercose, podemos sintetizar o seguinte:

CASO 61 — J. P., sexo masculino, 41 anos de idade. História clínica de mais ou menos 8 anos, com queixas múltiplas nas quais predominam o desânimo e a fraqueza geral. Há 6 meses teve crise convulsiva tipo GM. Ao exame físico: cisticercose cutânea generalizada (comprovada por biópsia). Diagnóstico: cisticercose cerebral. O líquido cefalorraquidiano por punção SOD, ou seja por via suboccipital em decúbito lateral, mostrou: pressão inicial 23 (manômetro de Claude); 30,4 células por μ l (linfócitos 94%, monócitos 5%, eosinófilos 1%); proteínas totais 84 mg por 100 ml; r. de Pandý +++; r. de Nonne-Appelt +++ . Reação de Wassermann negativa.

CASO 70 — M. L. Z., sexo feminino, 7 anos de idade. História clínica de um ano. Cefaléia persistente predominantemente da região da nuca, por vèzes acompanhada de crises de vômito de tipo cerebral. Há 2 meses crise convulsiva única. Nos antecedentes, teniase. Ao exame físico: edema de papila frustro bilateral. Ausência de outros sintomas e sinais neurológicos ou psíquicos. Suspeita clínica: cisticercose cerebral. O líquido cefalorraquidiano (punção SOD) mostrou: pressão inicial 27 (manômetro de Claude); 36 células por μ l (linfócitos 86%, monócitos 12%, eosinófilos 2%); proteínas totais 116 mg por 100 ml; r. Pandý +++; r. Nonne-Appelt +++; r. de Wassermann negativa.

CASO 71 — E. A. H. P., sexo feminino, 8 anos de idade. História clínica de 4 meses. Cefaléia e vômitos por crises. Febrícula. Ao exame físico: bom estado geral, paresia do reto externo à direita. Edema de papila bilateral. Ausência de outros distúrbios neurológicos ou psíquicos. Diagnóstico clínico: síndrome de hipertensão intracraniana (meningite tuberculosa? cisticercose cerebral?). O líquido cefalorraquidiano (punção SOD) mostrou: pressão inicial 23 (manômetro de Claude); 30,4

células por μ l (linfócitos 94%, monócitos 5%, eosinófilos 1%); proteínas totais 84 mg por 100 ml; r. Pandy +++; r. Nonne-Appelt +++. Reação de Wassermann negativa.

CASO 98 — D. C., sexo masculino, 6 anos de idade. História clínica de 3 meses. Crises de cefaléia, vômitos e entorpecimento intelectual com duração de dias. Ao exame físico: torpor leve, ligeira rigidez da nuca. Subfebril (37°,8C). Paresia do reto externo à direita, sem outros distúrbios neurológicos. Diagnóstico: meningite tuberculosa? cisticercose cerebral? O líquido cefalorraquidiano (punção SOD) mostrou: pressão inicial prejudicada; 80 células por μ l (linfócitos 89%, monócitos 11%, presença de granulações eosinófilas); proteínas totais 98 mg por 100 ml; r. Pandy +++; r. Nonne-Appelt ++. Reação de Wassermann negativa.

CASO 119 — P. G., sexo masculino, 54 anos de idade. História precária, sendo assinalados períodos de distúrbios mentais (déficit da memória, apatia, inércia), perturbações da fala do tipo afásico e crises convulsivas recentes. Paciente bradipsíquico com sensíveis distúrbios da memória para fatos recentes e com certo grau de mória. Ao exame físico: cisticercose cutânea generalizada (comprovada por biópsia). Diagnóstico: síndrome convulsiva, síndrome psíquica do lobo frontal, cisticercose cerebral? O líquido cefalorraquidiano (punção SOD) mostrou: 23 células por μ l (linfócitos 74,5%, monócitos 9%, eosinófilos 16%, basófilos 0,5%); proteínas totais 38 mg por 100 ml; r. Pandy ++; r. Nonne-Appelt +. Reação de Wassermann negativa.

No grupo IV, constituído de pacientes com reação de Wassermann positiva no líquor, a reação de fixação do complemento para cisticercose foi positiva em 2 casos, um dos quais pôde ser estudado.

CASO 145 — M. O., sexo masculino, 52 anos de idade. História de 5 anos aproximadamente, apresentando parestesia dos membros inferiores, ataxia na marcha e distúrbios urinários. Ao exame físico: síndrome radículo-cordonal posterior da medula e sinal de Argyll-Robertson. Diagnóstico: tabes. O líquido cefalorraquidiano (punção lombar) mostrou: 88 células por μ l (linfócitos 84,5%, monócitos 14%, eosinófilos 1,5%); proteínas totais 50 mg por 100 ml; r. Pandy ++; r. Nonne-Appelt ++; r. Weichbrodt ++. Reação de Wassermann positiva.

Neste caso nossa atenção foi chamada pela positividade da reação para cisticercose. Embora este paciente apresentasse um quadro clínico de neurosífilis, a cisticercose não pôde ser excluída, pois havia ausência de plasmócitos e presença de eosinófilos no líquor. Tal quadro somente em caráter excepcional poderia ser explicado unicamente pela infecção luética¹¹.

Não acreditamos que neste caso a reação positiva para cisticercose possa ser considerada como efeito não específico da sífilis, pois verificamos nos 29 casos deste grupo (grupo IV) com positividade da reação de Wassermann no líquido cefalorraquidiano apenas um outro caso com reação positiva para cisticercose.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados mostram que a especificidade e sensibilidade da reação de fixação do complemento, praticada no líquido cefalorraquidiano, com o novo antígeno de *Cysticercus cellulosae*, em provas com 3 unidades de complemento, permitem recomendá-la para diagnóstico da cisticercose cerebral humana.

RESUMO

O autor descreve um novo antígeno de *Cysticercus cellulosae* e apresenta os resultados obtidos com o seu emprêgo na reação de fixação do complemento com líquido cefalorraquidiano, para diagnóstico da cisticercose cerebral.

O antígeno é preparado com vesículas de *C. cellulosae* obtidas de porcos infestados. As vesículas são lavadas várias vezes em solução fisiológica e secadas em papel de filtro. O material sêco é extraído com benzeno, durante 24 horas, à temperatura ambiente; o benzeno é desprezado e a extração repetida várias vezes. O material é, então, colocado no vácuo, sôbre cloreto de cálcio e, finalmente, extraído com 20 volumes de álcool metílico absoluto, durante 25 dias. O sobrenadante obtido após centrifugação (10.000 G durante 15 minutos a 3°C-6°C) é o antígeno que é conservado em geladeira.

A reação de fixação do complemento é estandardizada, segundo o método da isofixação, pela técnica quantitativa de Wadsworth, Maltaner e Maltaner.

Os resultados obtidos com líquidos cefalorraquidianos de pacientes com cisticercose cerebral e outras condições mostram que o método usado com o novo antígeno é recomendável para o diagnóstico da cisticercose cerebral humana.

SUMMARY

*Fixation complement test for cysticercosis in spinal fluid.
New antigen for quantitative method.*

A new *Cysticercus cellulosae* antigen is described and the results of complement-fixation reactions are presented. The antigen is prepared with vesicles of *C. cellulosae* from infected pig, washed several times with saline and dried on filter paper. The dried material is extracted with benzol for 24 hours at room temperature; the benzol is discarded and the extraction is repeated several times. The material is then dried over calcium chloride and extracted with 20 volumes of absolute methyl alcohol during 25 days. The liquid collected after centrifugation (10,000 G, during 15 minutes at low temperature) is kept in ice box and used as antigen. The complement fixation test was standardized by the isofixation method for the quantitative technic.

The results obtained with cerebrospinal fluid of patients suffering from cerebral cysticercosis and other conditions showed that the method used is a valuable test for the diagnosis of human cerebral cysticercosis.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. José de Oliveira Almeida, que leu os originais deste trabalho e ao Prof. José Lima Pedreira de Freitas as sugestões apresentadas; ao Prof. Paulo Pinto Pupo que estudou clinicamente os pacientes e fez sugestões de interesse; aos Drs. Oswaldo Lange, Antonio Spina-França, João Batista dos Reis e Aloysio

Mattos Pimenta que forneceram líqüores de pacientes com cisticercose cerebral; ao Dr. Odair de Oliveira que forneceu os líqüores de pacientes do Hospital Psiquiátrico "Santa Teresa"; à Dra. Alba Sanches as reações de Wassermann que fez nos casos apresentados; ao Dr. Isnard dos Reis os exames gerais dos líqüores estudados.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, J. O. — *a*) Isofixation curves as a method for standardization of quantitative complement fixation test. *J. Immunol.*, 76:259-263, 1956; *b*) Comunicação pessoal, 1956.
2. FREITAS, J. L. P.; ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. *O Hospital*, 35:787-800, 1949.
3. LANGE, O. — *a*) O líqüido cefalorraquidiano na cisticercose do sistema nervoso central. *Rev. Neurol. e Psychiat. de São Paulo*, 2:3-11, 1936; *b*) Síndrome líqüórica da cisticercose encefalomeningéa. *Rev. Neurol. e Psychiat. de São Paulo*, 6:35-38, 1940.
4. MONTEIRO SALLES, F. J. — Cisticercose Cerebral. Tese da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1934.
5. MOSES, A. — Dos métodos biológicos de diagnóstico da cisticercose cerebral. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3:320-327, 1911.
6. NIETO, D. — Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology*, 6:725-738, 1956.
7. PESSOA, S. B.; FLEURY DA SILVEIRA, J. — Sobre a reação de fixação de complemento e outros métodos de laboratório para o diagnóstico da cisticercose. *São Paulo Med.*, 2:499-517, 1929.
8. PINTO PUPO, P.; CARDOSO, W.; REIS, J. B.; SILVA, C. P. — Sobre a cisticercose encefálica. Estudo clínico, anátomo-patológico, radiológico e do líqüido cefalorraqueano. *Arq. Assist. Psicop. Est. São Paulo*, 10-11:3-123, 1945-1946.
9. REINLEIN, J. M. A.; TRIGUEROS, E. A.; ALCALDE, S. O. — The study of cerebrospinal fluid in diagnosis of cysticercosis of the central nervous system. *Bull. Inst. M. Research (Madrid)*, 4:65-76, 1951.
10. REIS, J. B. — Contribuição do laboratório para o diagnóstico da cisticercose encefálica. *Resumo in Rev. Paulista de Med.*, 43:164-165, 1953.
11. REIS, J. B.; BEI, A.; DINIZ, H. B. — Dificuldades no diagnóstico diferencial entre cisticercose encefálica e neurolues. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)*, 7:156-164, 1949.
12. SPINA-FRANÇA, A. — Cisticercose do sistema nervoso central. *Rev. Paulista de Med.*, 48:59-70, 1956.
13. THOMPSON, W. R.; ALMEIDA, J. O. — Use of model system to indicate presence of a second agent in tuberculosis antigen preparation. Em publicação.
14. WADSWORTH, A. B. — Standard Methods of Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1947, págs. 261-454.

Faculdade de Medicina — Departamento de Parasitologia — Ribeirão Preto — Estado de São Paulo, Brasil.