

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO HUMANA PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* ESTUDO COMPARATIVO DE TESTES DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO, IMUNOFLUORESCÊNCIA, HEMAGLUTINAÇÃO E FLOCULAÇÃO, EM 3.624 SOROS

Mario E. CAMARGO (1), Sumie HOSHINO-SHIMIZU (1), Vanize MACEDO (2), Benedito
A. PERES (3) e Cleudson CASTRO (4)

RESUMO

Para estudo comparativo de diferentes testes destinados ao diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*, foram confrontados os resultados dos testes de fixação do complemento (FC), imunofluorescência (IF), hemaglutinação (HA) e floculação (FO), em 3.624 soros. Houve concordância total de resultados em 97,0% dos soros, com todos os testes positivos em 994 (27,4%) e todos negativos em 2.522 (69,6%). Os 30 soros (0,8%) que apresentaram três testes positivos foram considerados como reagentes, enquanto 65 soros (1,8%) com apenas um teste positivo foram considerados como não reagentes. De resultados duvidosos, foram considerados os 13 soros (0,4%) que apresentaram apenas dois testes positivos. Desse modo, a associação de dois testes quaisquer foi satisfatória para revelar todos os soros considerados reagentes. A sensibilidade relativa de cada teste, indicada pela porcentagem de amostras positivas dentre as reagentes, foi de 99,2% para FC, 99,9% para IF, 99,0% para HA e 98,9% para FO. A especificidade relativa, ou porcentagem de negatividade para amostras não reagentes, foi respectivamente de 99,9% para FC, 99,7% para IF, 99,6% para HA e 98,3% para FO. Os resultados indicam estreita concordância, que decorreu da padronização satisfatória dos testes.

INTRODUÇÃO

Pode-se detectar anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* no soro já precocemente na fase aguda da infecção, os quais se mantêm presentes, daí em diante, na fase crônica da doença de Chagas, tanto nas formas sintomáticas como inaparentes. O diagnóstico da infecção pode ser feito pela demonstração desses anticorpos e, para tal fim, foram desenvolvidos vários testes sorológicos, a partir do trabalho pioneiro de Guerreiro e Machado em 1913¹³.

Na verdade, o diagnóstico sorológico assume grande importância na Tripanossomíase

Americana, diante das limitações que apresentam os diagnósticos clínico e parasitológico. Assim, a identificação clínica da infecção é dificultada pela elevada porcentagem de formas inaparentes e, nos casos sintomáticos, as manifestações clínicas podem ser consideradas apenas como sugestivas mas não patognomônicas da infecção chagásica. O diagnóstico parasitológico é bastante facilitado pela elevada parasitemia nas fases iniciais da doença, mas torna-se pouco sensível e moroso na fase crônica, quando a pesquisa do parasita passa a exigir técnicas complexas de enrique-

Pesquisa realizada com auxílios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq (2395/75 — SIP/08-061) e da Organização Mundial da Saúde (TRY — T8/181/8 — 1975)

- (1) Professor-assistente, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil
- (2) Professor de Medicina Tropical, Universidade de Brasília
- (3) Auxiliar de Ensino, Instituto de Ciências Biomédicas, USP
- (4) Mestrando de Medicina Tropical, Universidade de Brasília

cimento, como o xenodiagnóstico ou a hemocultura.

Devido à sua importância para fins diagnósticos, a sorologia da doença de Chagas deve se apoiar em testes de alta fidedignidade. Devido a falsos resultados negativos, podem ocorrer infecções por transfusões de sangue, acidentes estes que já se configuram como grave problema de Saúde Pública na América Latina^{1,8,11}. Os falsos resultados positivos também podem ter sérias implicações pelos problemas pessoais e sociais não raramente acarretados aos portadores de resultados sorológicos positivos⁶.

Entretanto, apesar da presença constante de anticorpos nas pessoas infectadas, o diagnóstico sorológico da doença de Chagas ainda apresenta sérias limitações, decorrentes principalmente da falta de padronização de reagentes e de procedimentos técnicos. A grande variabilidade de resultados entre laboratórios e até entre partidas de um mesmo reagente levou à constituição, pela Organização Pan Americana da Saúde, de um Grupo de Estudos da Sorologia da Doença de Chagas. Destinado a buscar a desejada padronização, o grupo desenvolveu técnicas para a produção e padronização de antígenos do parasita destinados à reação de fixação do complemento, bem como normas para a estandardização dessa reação, ainda não publicadas.

Os problemas atuais do diagnóstico sorológico são bem ilustrados por PRATA & col.¹⁸, que ainda recentemente verificaram grande disparidade de resultados entre três laboratórios ao submeterem ao teste de fixação do complemento alíquotas das mesmas amostras de soros. A positividade do teste em casos crônicos parasitologicamente comprovados, variou amplamente, com valores de 64%, 89% e 95%, respectivamente para os diferentes laboratórios. Quanto às divergências entre resultados de testes diferentes, é expressivo o trabalho de BARUFFA & ALCÂNTARA FILHO².

O aprimoramento do diagnóstico sorológico da doença de Chagas exige a solução de dois problemas diversos, a padronização de um teste de referência e o desenvolvimento de testes simples e econômicos para fins de rotina.

É indispensável que se escolha um teste de referência cujos resultados possam servir como paradigma para a avaliação de outros testes ou de novos reagentes. Essa avaliação encontra sério obstáculo na dificuldade de se determinar com segurança a presença ou a ausência da infecção, ou seja, de se obter um diagnóstico de certeza, que nem exames clínicos nem métodos parasitológicos podem dar. Por outro lado, a avaliação da sensibilidade de testes sorológicos em pacientes com exames parasitológicos positivos pode introduzir fator de erro, pela seleção de casos de elevada parasitemia e exclusão dos demais. De maneira semelhante, os índices de especificidade obtidos em populações isentas de infecção tripanossômica podem não ser aplicáveis a populações expostas a essa tripanossomíase, de habitats diversos e sujeitas a estímulos antigênicos diferentes, apresentando ainda características genéticas ou nutricionais diversas e que podem interferir na resposta imunológica. Tais fatos não constituem exceções em trabalhos de soropidemiologia⁴.

Além de apresentar condições de rigorosa padronização, o teste de referência deverá conquistar conceito de especificidade e de sensibilidade elevadas, o que somente poderá resultar de longa vivência com o mesmo, através da análise simultânea de dados clínicos, parasitológicos e epidemiológicos. Foi o que ocorreu com reações sorológicas hoje consideradas de referência, como o teste de imobilização do *Treponema pallidum*¹⁷, para a sífilis, e o teste do corante, de SABIN & FELDMAN¹⁹, para a toxoplasmose.

Justamente com a finalidade de se adquirir tal experiência com diferentes testes sorológicos para a Tripanossomíase Americana, está sendo realizado estudo conjunto, do Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília, em pessoas residentes na área de Mambai, Estado de Goiás. Nesta publicação inicial, levaram-se em conta apenas os dados sorológicos, estudando-se comparativamente os resultados de quatro testes: de fixação do complemento (FC), imunofluorescência anti-IgG (IF), hemaglutinação (HA) e floculação (FO). No presente estudo foram incluídos também

os resultados dos testes em residentes da cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros

Amostras de sangue de punção venosa foram deixadas coagular e os soros separados ainda na área de colheita. As amostras de soros foram refrigeradas para transporte e, quando recebidas no laboratório, divididas em alíquotas e conservadas a -20°C até o uso. Para os testes, uma alíquota foi degelada e depois inativada a 56°C por 30 minutos. Estudaram-se 2.168 soros de Mambai e 1.456 de São Paulo, no total de 3.624 amostras.

Testes sorológicos

Reação de fixação do complemento — O preparo do antígeno, baseado em MAEKELT¹⁶, foi feito a partir de culturas de *T. cruzi*, cepa Y, mantida anos seguidos no Laboratório, por passagens em camundongos e em sucessivos repiques em meio de cultura líquido (meio de LIT)¹². Após crescimento por 7 a 10 dias a 28°C , os tripanossomas foram sedimentados e lavados por 3 vezes em grandes volumes de solução de NaCl a 0,85% e liofilizados. O material liofilizado foi extraído com benzol, 5 vezes sucessivas por 15 minutos à temperatura ambiente, em homogeneizador de tecidos com rotor mecânico, usando-se um total de 25 ml de benzol para 50 mg de parasitas e removendo-se o benzol de cada vez, após centrifugação do material. O material extraído foi seco sob vácuo e suspenso em 5 ml de solução salina tamponada com trietanolamina. A suspensão foi submetida a ultrassom, por um total de 5 minutos, com oscilações de 40 Hz, em banho de gelo, em períodos intercalados de 1 minuto, com sucessivas interrupções para evitar aquecimento excessivo. A suspensão foi centrifugada a $5.000 \times G$ e ao sobrenadante adicionou-se igual volume de glicerina neutra, p.a. O antígeno assim obtido foi conservado a -20°C . Eventualmente, o sobrenadante foi distribuído em frascos ou ampolas e liofilizado, conservando-se em seguida a 4°C até o uso. Neste caso, ao ser reconstituído com água destilada, adicionava-se também glicerina e a mistura era mantida a -20°C .

Para a reação de fixação do complemento utilizou-se microtécnica em placas plásticas escavadas, com cavidades em U, com volumes de 1 gota (0,025 ml) respectivamente para soro, antígeno e complemento, adequadamente diluídos em solução salina tamponada com trietanolamina, com Ca^{++} e Mg^{++} ¹⁵. Empregaram-se quatro unidades 50% de complemento e antígeno diluído para reatividade máxima. Sucessivas partidas de antígeno mostraram reatividade máxima até cerca de 1:400, sendo utilizados nos testes diluídos a 1:200. Após a incubação das placas por cerca de 18 horas a 4°C e por 30 minutos a 37°C , adicionava-se a cada cavidade uma gota de suspensão de hemácias de carneiro, a 2% em solução salina tamponada, otimamente sensibilizadas por hemolisina. Após 1 hora a 37°C , com agitação freqüente, as placas eram centrifugadas ou deixadas em geladeira para sedimentação e lidas em seguida. Os testes foram realizados com soro diluído a 1:2, para a reação e para testemunha do soro. Quando os soros se mostraram anticomplementares, submeteram-se ao teste diluições seriadas, de razão 2, eliminando-se assim os resultados inconclusivos por anticomplementaridade. Foram sempre incluídas também testemunhas de soro padrão, positivo e negativo, e do complemento. Foram consideradas reagentes as diluições de soro que produziam hemólises de 50% ou menos, em ausência de atividade anticomplementar.

Reação de imunofluorescência — Foi feita como descrito⁹, com conjugado específico anti-IgG (Hyland Travenol Laboratories, USA) e com formas de cultura do *T. cruzi*, lavadas, fixadas em formalina a 1% e liofilizadas. Para uso, os parasitas eram reconstituídos em água destilada e a suspensão fixada em lâminas de microscopia. Para ensaios, as amostras de soro foram diluídas a 1:30 em PBS.

Reação de hemaglutinação — Foi feita como descrito⁷, com reagente estável, preparado pela sensibilização de hemácias humanas formolizadas com extratos de formas de cultura de *T. cruzi*, e preservado por liofilização.

Reação de floculação — Seguiu-se a técnica anteriormente descrita^{10,14}.

RESULTADOS

O número de amostras positivas foi bastante semelhante para os quatro testes. Os soros de residentes da área de Mambai mostraram positividade da ordem de 38%, porcentagem que deve exprimir a prevalência da infecção naquela população, pois que as amostras foram colhidas ao acaso. Já as amostras de residentes da cidade de São Paulo correspondiam a casos clinicamente selecionados para confirmação sorológica, e para estas os testes indicaram positividade de cerca de 15%. Para o total dos soros estudados houve cerca

de 30% de amostras positivas (Quadro I).

Houve concordância de resultados dos quatro testes para 97,0% dos soros, com 994 amostras reagentes em todos os testes e 2.522 não-reagentes. Os soros com resultados divergentes foram distribuídos segundo os diferentes perfis de resultados, como indicado no Quadro II.

Calcularam-se os índices de co-positividade, co-negatividade e concordância³ dos vários testes tomando-se sucessivamente, cada um destes como teste de referência como expresso no Quadro III.

QUADRO I

Resultados positivos de testes para a Tripanossomíase americana, em dois lotes de soros

Testes	2.168 soros de Mambai (GO)	1.456 soros de São Paulo (SP)	3.624 soros no total
Fixação do complemento	810 37,4%	212 14,6%	1.022 28,2%
Imunofluorescência IgG	826 38,1%	213 14,6%	1.039 28,7%
Hemaglutinação	819 37,8%	213 14,6%	1.032 28,5%
Floculação	827 38,2%	237 16,3%	1.064 29,4%

QUADRO II

Soros distribuídos segundo a reatividade nos diferentes testes para a Tripanossomíase americana

Nº de testes positivos	Perfis sorológicos				Nº de soros	Porcentagem
	FC	IF	HA	FO		
0	0	0	0	0	2.522	97,02
4	+	+	+	+	994	
3	+	+	+	0	11	9,83
	+	+	0	+	10	
	+	0	+	+	1	
	0	+	+	+	8	
2	+	+	0	0	1	0,36
	+	0	+	0	2	
	+	0	0	+	1	
	0	0	+	+	3	
	0	+	0	+	4	
	0	+	+	0	2	
1	+	0	0	0	2	1,79
	0	+	0	0	9	
	0	0	+	0	11	
	0	0	0	+	43	

Q U A D R O I I I

Índices de co-positividade, de co-negatividade e de concordância entre quatro testes para a Tripanossomíase americana, em 3.624 soros com prevalência estimada em 29,4%

Testes	Co-positividade	Co-negatividade	Concordância
IF/FC	0,9941	0,9889	0,9903
HA/FC	0,9863	0,9908	0,9881
FO/FC	0,9843	0,9777	0,9796
FC/IF	0,9779	0,9954	0,9903
HA/IF	0,9768	0,9934	0,9887
FO/IF	0,9779	0,9814	0,9084
FC/HA	0,9767	0,9946	0,9895
IF/HA	0,9835	0,9907	0,9887
FO/HA	0,9748	0,9776	0,9768
FC/FO	0,9455	0,9938	0,9796
IF/FO	0,9548	0,9910	0,9804
HA/FO	0,9455	0,9898	0,9768

FC = fixação do complemento; IF = imunofluorescência anti-IgG; HA = hemaglutinação; FO = floculação.

D I S C U S S Ã O

Em publicação recente⁹, tivemos oportunidade de assinalar a estreita concordância obtida no diagnóstico sorológico da infecção chagásica, tanto entre resultados de dois testes diferentes como entre laboratórios diversos, quando alíquotas de mesmos soros foram ensaiadas. Assim, em 1.123 amostras de soro, com positividade de cerca de 2%, entre os 2 laboratórios houve concordância de resultados do teste de fixação do complemento em 98,3% dos soros, e do teste de hemaglutinação em 99,2%. A concordância de resultados entre os testes de fixação do complemento e de hemaglutinação foi de 99,4% e de 98,5%, respectivamente em cada laboratório.

Esta observação contrasta com outras referências na literatura, que não raro assinalam discrepâncias acentuadas não só entre testes diferentes como para um mesmo teste quando realizado em laboratórios diversos^{2,18}.

Na presente publicação, procuramos ampliar essas observações para amostras com maior prevalência de soros reagentes e estendendo a comparação a quatro testes. Cada um desses testes foi realizado independentemente por técnicos diferentes, e os resultados comparados posteriormente.

Os resultados indicam excelente concordância entre os testes, pois que estes mostraram comportamento idêntico em 97,0% dos soros. As divergências observadas nas amostras restantes podem decorrer tanto de falsos resultados positivos como de falsos resultados negativos. Na falta de um diagnóstico de certeza e de acordo com as probabilidades, consideramos como reagentes, dentre estas amostras, os soros que apresentaram três testes positivos e um negativo. Este foi tomado, então, como falso negativo. Igualmente, consideramos como não reagentes as amostras com apenas um teste positivo, tomado como falso resultado. Houve apenas 13 soros que apresentaram dois testes positivos e dois testes negativos, que consideramos como de resultado duvidoso e que representaram apenas 0,4% das amostras examinadas.

Calculou-se, para cada teste, a sensibilidade relativa considerada como porcentagem de resultados positivos obtidos para os soros reagentes, bem como a especificidade relativa, porcentagem de resultados negativos para os soros não reagentes. Os resultados estão reunidos no Quadro IV e traduzem a uniformidade dos diferentes testes sorológicos quanto aos resultados e exprimem sua alta confiabilidade.

CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; MACEDO, V.; PERES, B. A. & CASTRO, C. — Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e floculação, em 3.624 soros. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19:254-260, 1977.

Q U A D R O I V

Sensibilidade relativa e especificidade relativa de testes sorológicos para o diagnóstico da Tripanossomíase Americana

Testes	Sensibilidade relativa	Especificidade relativa
FC	1016/1024 — 99,22%	2585/2587 — 99,92%
IF	1023/1024 — 99,90%	2578/2587 — 99,65%
HA	1014/1024 — 99,02%	2576/2587 — 99,57%
FO	1013/1024 — 98,93%	2544/2587 — 99,34%

Desse modo, a associação de dois testes quaisquer permitiu identificar como reagentes todos os 1.024 soros assim considerados.

A estreita concordância entre resultados de testes baseados em princípios tão diversos traduz o grau de padronização técnica conseguida, tanto na preparação dos reagentes como na execução dos testes. Concretiza-se desse modo, uma base sorológica aparentemente sólida que permitirá a avaliação de reagentes comerciais e de novos testes sorológicos, bem como poderá fornecer subsídios para a adoção de normas para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas, em âmbito nacional.

S U M M A R Y

Serologic diagnosis of human *T. cruzi* infection. Comparative study of complement fixation, immunofluorescence, hemagglutination and flocculation tests in 3,624 serum samples

In order to compare the results of complement fixation, immunofluorescence, hemagglutination and flocculation tests for American trypanosomiasis serodiagnosis, 3,624 serum samples were studied.

A total agreement was found for 97.0% of sera, from which 994 (27.4%) were reactive in all tests and 2,522 (69.6%) non-reactive. With only three positive tests there were 30 samples (0.83%), also considered as reactive. Sixty five sera (1.79%) presented only 1 positive test and were considered as non-reactive. Sera presenting 2 positive and 2 negative tests, in number of 13 (0.36%), were taken as doubtful. In this way it was observed that every reactive serum could be detected by associating any of 2 tests.

Relative sensibility was found to be 99.2% for complement fixation, 99.9% for immunofluorescence, 99.0% for hemagglutination and 98.9% for flocculation test. Relative specificities were respectively 99.9%, 99.7%, 99.6% and 98.3% for the same tests. The close agreement of results indicated a very satisfactory technical standardization of the tests.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AMATO NETO, V. & col. — Análise, por meio da reação de fixação do complemento, do risco de aquisição da doença de Chagas através da hemoterapia, por parte de pacientes politransfundidos. *Rev. Goiânia Med.* 21:1-9, 1975.
2. BARUFFA, G. & ALCANTARA FILHO, A. — Comparação entre a fixação do complemento em placa, a hemoaglutinação e a prova de aglutinação com latex no diagnóstico sorológico da doença de Chagas na zona sul do Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 9:121-127, 1975.
3. BUCK, A. A. & GART, J. J. — Comparison of a screening test and a reference test in epidemiological studies. I — Indices of agreement and their relation to prevalence. *Amer. J. Epidemiol.* 83: 586-592, 1966.
4. BUCK, A. A. & ANDERSON, R. I. — Validation of the complement fixation and slide flocculation tests for schistosomiasis. Geographic variations of test capacities. *Amer. J. Epidemiol.* 96:205-214, 1972.
5. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:227-234, 1966.
6. CAMARGO, M. E. — Reacciones serologicas y consecuencias sociales de los resultados positivos a la enfermedad de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panamer.* 72:576-582, 1972.

CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; MACEDO, V.; PERES, B. A. & CASTRO, C. — Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e floculação, em 3.624 soros. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19:254-260, 1977.

7. CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & SIQUEIRA, G. R. V. — Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:81-85, 1973.
8. CAMARGO, M. E. & LESER, P. G. — Diagnóstico acidental de laboratório de infecções chagásicas agudas postransfusionais não suspeitadas. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 20:335-336, 1974.
9. CAMARGO, M. E.; BATISTA, S. M. & HOSHINO-SHIMIZU, S. — Avaliação de reagente liofilizado de hemaglutinação para diagnóstico da Tripanosomíase americana. Estudo em 1.123 soros de doadores de sangue. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17:350-354, 1975.
10. CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & UMEZAWA, E. S. — Further evaluation of the «IMT - Chagas flocculation test». A comparison with complement fixation, hemagglutination and immunofluorescence tests. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17:230-235, 1975.
11. CERISOLA, J. A. & col. — Enfermedad de Chagas y la transfusion de sangre. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 63:203-221, 1972.
12. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 18:195-202, 1966.
13. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil-Med.* 27:225-226, 1913.
14. HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. E. & UMEZAWA, E. S. — A rapid slide flocculation test for the diagnosis of American trypanosomiasis using *Trypanosoma cruzi* fragments preserved by lyophilization. Comparison with hemagglutination, immunofluorescence and complement fixation test. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 24:586-589, 1975.
15. KENT, J. F. & FIFE JR., E. H. — Precise standardization of reagents for complement fixation. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 12:103-116, 1963.
16. MAEKELT, G. A. — Die Komplementbindung. Reaktion der Chagaskrankheit. *Zsch. Tropenmed. Parasit.* 11:152-168, 1960.
17. NELSON JR., R. A. & MAYER, M. M. — Immobilization of *Treponema pallidum* in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *J. Exp. Med.* 89:369-392, 1949.
18. PRATA, A.; MAYRINK, W.; SODRÉ, A. G. & ALMEIDA, J. O. — Discrepâncias relativas entre resultados de reações de Guerreiro e Machado executadas em 3 diferentes laboratórios. *Rev. Patol. Trop.* 4:35-38, 1975.
19. SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. — Dyes as microchemical indicator of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108:660-663, 1948.

Recebido para publicação em 21/10/1976.