

## DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO NA DOENÇA DE CHAGAS ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS (\*)

Alair Perini FUCHS (1), Vera Lucia FIORATTI (2), Vladimir Alberto de MELLO (3) e Elias BOAINAIN (4)

### RESUMO

Os resultados de quatro técnicas sorológicas para o diagnóstico da infecção chagásica: reação de fixação do complemento (RFC), reação de hemaglutinação indireta (IHA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação imunoenzimática ("ELISA"), foram analisados comparativamente em 684 amostras de soros de pacientes (Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia, São Paulo, Brasil), dos quais 412 apresentaram quadro clínico, eletrocardiográfico ou radiológico sugestivos de doença de Chagas e 272 apresentaram quadros mórbidos de etiologia não chagásica. A associação entre doença de Chagas e positividade sorológica mostrou-se mais evidente diante dos resultados de "ELISA" e RIFI, enquanto que na amostra de pacientes com patologias não atribuíveis à etiologia chagásica os resultados das quatro técnicas foram essencialmente concordantes.

### INTRODUÇÃO

Com altos índices de prevalência e morbidade, a doença de Chagas é um dos maiores problemas de Saúde Pública em toda a América Latina. A Organização Mundial de Saúde estima em sete milhões o número de indivíduos infectados por *T. cruzi*<sup>1</sup>. Em nosso país, o Ministério da Saúde admite a existência de quatro milhões de brasileiros com essa parasitose<sup>2</sup>.

Segundo BOAINAIN & col.<sup>3</sup>, 8,8% dos pacientes matriculados no então Instituto de Cardiologia do Estado (atual Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia) eram portadores de infecção chagásica. Este resultado foi obtido utilizando apenas a reação de fixação de complemento, de Guerreiro Machado. Tal porcentagem evidenciou a importância desta patologia nas grandes cidades e a necessidade de maiores pesquisas para o seu diagnóstico e tratamento.

É de grande importância a contribuição do laboratório clínico no diagnóstico etiológico em casos onde a suspeita clínica é compatível com a doença de Chagas.

No presente trabalho nos propomos estudar a concordância ou não entre resultados das reações sorológicas com o diagnóstico clínico da infecção chagásica. As reações sorológicas empregadas foram: reação de fixação do complemento (RFC), reação de hemaglutinação indireta (IHA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação imunoenzimática ("ELISA").

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Soros

Amostras de sangue obtidas por punção venosa, foram deixadas coagular à temperatura

(\*) Trabalho realizado no Setor de Miocardiopatias do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia, São Paulo, Brasil

(1) Farmacêutica

(2) Técnica de Laboratório

(3) Acadêmico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

(4) Chefe do Setor

ambiente por 1 hora, centrifugadas a 2000 rpm. durante 15 minutos e os soros armazenados, sem nenhum aditivo, a 18°C e utilizados para a reação no período de 15 a 30 dias.

Das 684 amostras de soro utilizadas, 412 eram provenientes de pacientes com diagnóstico clínico compatível com infecção chagásica e 272 de pacientes com etiologia não chagásica. A seleção de amostras foi feita ao acaso entre os soros coletados na rotina do laboratório durante um período de 4 meses (maio a setembro de 1979).

### Provas sorológicas

#### 1) Reação de Imunofluorescência indireta — RIFI

Foi feita com antígeno preparado de uma suspensão de formas epimastigotas de *T. cruzi*, cultivadas em meio de LIT, a 28°C durante 7 dias, lavadas em solução salina tamponada com fosfatos a 0,01 M, pH 7,2, previamente tratadas pelo formol a 1% e fixada em lâminas. Foi empregado o conjugado liofilizado de anti-globulina humana caprina (BBL-Becton, Dickinson & C.O., U.S.A.) e as leituras foram feitas em microscópio "Wild", com luz ultra-violeta proveniente de lâmpada "Osram" HBO-200W/4. As amostras de soros foram diluídas a 1/32, em solução salina tamponada com fosfatos.

#### 2) Reação de hemaglutinação indireta — IHA

Os soros dos pacientes foram diluídos em tampão Tris-HCl em placas de lucite com fundo em V, com diluições de 1/16, 1/32, 1/64 e sucessivamente até 1/2048. Foram considerados títulos significativos, aqueles com reações positivas acima da diluição 1/64. O reagente de hemaglutinação indireta (Behringwerke A. G. Marburg — partida n.º 10273) foi dissolvido em água destilada uma hora antes da reação. As leituras foram feitas por observação visual após 3 a 4 horas.

#### 3) Reação de fixação do complemento — RFC

Foi realizada segundo a técnica de Kolmer (100% de hemólise). O antígeno de *T. cruzi*, benzeno cloroformado (Lio-Serum, Ribeirão Preto) foi utilizado após determinação prévia do título. O complemento liofilizado (Instituto

Adolfo Lutz) foi dissolvido e previamente titulado.

#### 4) Reação imunoenzimática — "ELISA"

Foi realizada segundo a técnica VOLLER<sup>5</sup>. Os soros dos pacientes diluídos a 1/200, foram testados em placas de luçite com fundo chato sensibilizadas com antígeno solúvel de *T. cruzi*. Os anticorpos fixados foram quantificados por meio de um reagente composto de anti-globulina marcada com fosfatase alcalina e revelada em seguida pela adição do substrato (Johnson & Johnson). As leituras foram feitas sucessivamente, por observação visual e por fotometria (Zeiss PM-2 DL — D.O.405nm).

### RESULTADOS

Os resultados das reações sorológicas foram separados de acordo com o quadro clínico dos pacientes. Na Tabela I temos em números absolutos e em porcentagem os casos reagentes, não-reagentes, duvidosos ou anti-complementares dos pacientes com quadro clínico compatível com infecção chagásica.

Observa-se na Tabela I que 392 se revelaram reagentes por meio da RIFI e 406 por meio da "ELISA", enquanto que RFC e IHA revelaram, respectivamente, 301 e 310 soros reagentes. Quando comparadas as quatro técnicas, as de RIFI e "ELISA" demonstraram ser mais sensíveis. Foram considerados duvidosos quatro casos de "ELISA" e vinte de IHA, anticomplementares três de RFC.

A Tabela II mostra os resultados de amostras obtidas de pacientes com patologia não atribuível a infecção chagásica.

Nos 272 pacientes considerados, a reação de RIFI foi negativa em 262, a "ELISA" em 259, a RFC em 267 e a IHA em 264 como se observa na Tabela II, o que demonstra concordância nos resultados das quatro técnicas por nós utilizadas.

Em nenhum dos 272 pacientes houve mais do que uma reação sorológica positiva.

Na Tabela III os soros positivos dos pacientes com quadro clínico atribuível a etiologia chagásica são relacionados à forma clínica da doença: indeterminada, cardíaca ou digestiva.

TABELA I

Resultados obtidos com quatro técnicas sorológicas em 412 pacientes com diagnóstico clínico compatível com doença de Chagas

	RIFI		ELISA		RFC		IHA	
	N.º soros	%						
Reagentes	392	95,1	406	98,5	301	73,1	310	75,2
Não reagentes	20	4,9	2	0,5	108	26,2	82	19,9
Anticomplementar	—	—	—	—	3	0,7	—	—
Duvidosos	—	—	4	1,0	—	—	20	4,9
Total	412	100,0	412	100,0	412	100,0	412	100,0

TABELA II

Resultados obtidos com quatro técnicas sorológicas em 272 pacientes com patologia não atribuível a etiologia chagásica

	RIFI		ELISA		RFC		IHA	
	N.º soros	%						
Reagentes	10	3,7	7	2,6	3	1,1	5	1,8
Não reagentes	262	96,3	259	95,2	267	98,2	264	97,1
Anticomplementar	—	—	—	—	2	0,7	—	—
Duvidosos	—	—	6	2,2	—	—	3	1,1
Total	272	100,0	272	100,0	272	100,0	272	100,0

TABELA III

Distribuição de soros positivos segundo as diferentes formas clínicas da doença de Chagas

	Forma Indeterminada 186 pacientes		Forma Cardíaca 221 pacientes		Forma Digestiva 05 pacientes	
		%		%		%
RIFI	177	95,2	210	95,0	05	100,0
ELISA	183	98,4	218	98,6	05	100,0
RFC	128	68,8	169	76,5	04	80,0
IHA	141	75,8	165	74,7	04	80,0

Comparando os resultados obtidos na Tabela I e Tabela III não se evidenciou diferenças significativas nas provas sorológicas empregadas quando relacionadas com a forma clínica da doença. A sensibilidade maior das provas sorológicas observadas na forma digestiva não permite conclusão definitiva em virtude do pequeno número de pacientes.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho revelou que as reações sorológicas de RIFI e "ELISA" apresentaram sensibilidade maior do que a RFC e IHA: 95,2% e 98,5% para as primeiras e 73,1% e 75,2% para as últimas, respectivamente.

Estes resultados nos levam a propor que sejam sempre utilizadas as duas primeiras reações, como rotina, no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, nos pacientes que procuram o Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia.

Em trabalho anterior<sup>2</sup> a reação de hemaglutinação indireta (IHA) executada também em nosso laboratório com o mesmo reativo (Behring Werke A. G. Marburg partida n.º 172) mostrou-se com sensibilidade maior do que no presente estudo, fazendo supor interferência de outros fatores.

### SUMMARY

#### Serologic diagnosis in Chagas' disease. Comparative studies in different technicals

The results of four serological techniques: RFC, IHA, IFAT and ELISA were compared with different forms of Chagas' disease. Among 684 patients under treatment (Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia, São Paulo, Brasil), 412 showed clinical, electrocardiographic and radiological pictures suggestive of Chagas' disease and 272 cases, clinical pictures of non-related Chagas' disease.

Association between clinical pictures of Chagas' disease and serological positivity was more evident for IFAT and ELISA whereas, in non-related Chagas' disease all four serological tests showed agreeing negative results.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOAINAIN, E.; RASSI, A. & JATENE, A. D. — Prevalência da doença de Chagas em pacientes do Instituto de Cardiologia do Estado de São Paulo. Rev. Goiânia Med. 21: 129-130, 1975.
2. BOAINAIN, E. — Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. [Tese]. Rev. Goiânia Med. 25: 1-60, 1979.
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil) — Campanha Contra Doença de Chagas. Relatórios de atividades de 1975. Brasília, 1976.
4. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD — Enfermedad de Chagas. Série de Informes Técnicos n.º 202, Genebra, 1960.
5. VOLLER, A.; DRAPER, C. C.; BIDWELL, D. F. & BARTLETT, A. — Microplate enzyme — linked immunosorbent assay for Chagas' disease. Lancet 1: 426-428, 1975.

Recebido para publicação em 14/12/1979.