

ESTUDO DE ANTÍGENOS HEMAGLUTINANTES NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

S. M. BATISTA (1), W. MAYRINK (2), C. A. da COSTA (2), E. CHIARI (2) e A. A. S. PEREIRA (3)

RESUMO

Os Autores apresentam os resultados do teste de hemaglutinação no diagnóstico indireto da doença de Chagas empregando antígenos tratados por álcool-éter, acetona-butanol e com teor de proteínas conhecido. Estes foram comparados com um antígeno não tratado, obtido pela lise em água destilada das formas de cultura de *Trypanosoma cruzi*. Os soros empregados provieram de indivíduos em fase crônica da doença de Chagas apresentando xenodiagnóstico positivo. Julgam que o tratamento por álcool-éter diminui a sensibilidade do antígeno e que a relação proteínas/atividade aglutinante é variável segundo o antígeno empregado. Quanto à especificidade dos antígenos estudados, não encontraram reações cruzadas em Calazar, hanseníase e tuberculose pulmonar. Em 32 casos de leishmaniose muco-tegumentar obtiveram o teste positivo em dois casos nos quais a reação de fixação do complemento para a infecção tripanossômica foi reativa, sugerindo dupla infecção.

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos a demonstração indireta da infecção por *Trypanosoma cruzi* foi realizada praticamente pela reação de fixação do complemento (RFC) introduzida por GUERREIRO & MACHADO⁹. Entretanto este método apresenta inconvenientes que decorrem de insuficiente padronização do antígeno e de fenômenos de anticomplementaridade.

ROMAÑA¹⁶, ao aplicar o teste de hemaglutinação nessa protozoose, verificou ser este mais sensível e simples que a RFC, fato posteriormente comprovado por MONTANO & UCRÓS¹⁴, KNIERIM & SAAVEDRA¹⁰, CERISOLA & col.⁶, KNIERIM & RUBINSTEIN¹¹, CAMARGO & col.⁴ e LOPES & col.¹².

A partir dessa contribuição, iniciaram-se os estudos de padronização do método. Assim, CERISOLA & col.⁵, propõem um antígeno obtido pela lise de massas de culturas de *T. cruzi* com água destilada.

NEAL & MILES¹⁵ obtiveram um antígeno extraído por água destilada a partir de massas de cultura liofilizadas e que continham 312 microgramas de nitrogênio por mililitro. Esse antígeno após liofilização, mostrou-se ativo por 17 meses, conservado a -20°C.

CAMARGO & col.⁴ submeteram massas de tripanosomas ao processo de delipidação pelo álcool-éter e prepararam antígenos realizando a extração por vários métodos. Concluíram ser aquele obtido com o desoxicolato de sódio o que oferece melhores resultados. O antígeno foi padronizado pelo teor de proteínas. Verificaram também que uma sensibilização ótima é conseguida variando-se a concentração de proteínas de 10 a 50 microgramas por mililitro. Contudo, esse antígeno não se mostrou específico quando testado contra soros de portadores de leishmanioses.

Trabalho realizado no Departamento de Zoologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

- (1) Do Departamento de Zoologia e Parasitologia ICB-UFMG e Centro de Pesquisas "René Rachou" INERu — FIOCRUZ.
- (2) Departamento de Zoologia e Parasitologia ICB-UFMG.
- (3) Departamento de Bioquímica ICB-UFMG.

Procuramos analisar, paralelamente, os métodos de obtenção e purificação dos antígenos até então propostos, bem como experimentar um novo processo, com o intuito de selecionar aquele capaz de fornecer melhor sensibilidade e especificidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros — Empregamos 70 soros de portadores da doença de Chagas parasitologicamente comprovada, provenientes da Fundação Oswaldo Cruz (Posto de Bambuí) e do Hospital das Clínicas da UFMG (Serviço do Prof. J. Romeu Caçango).

Como controle de especificidade, utilizamos soros de pacientes comprovadamente positivos para Calazar, leishmaniose mucocuticular, hanseníase, tuberculose e 50 soros negativos, provenientes de indivíduos normais.

Amostras de *Trypanosoma cruzi* — Usamos as amostras: Y — isolada por SILVA & NUSSENZWEIG¹⁷; MR, FL e CL isoladas por BRENER & CHIARI², todas cultivadas em meio LIT, CAMARGO³.

Para a RFC, empregamos o antígeno melítico de BATISTA & SANTOS¹.

Antígenos hemaglutinantes — Os vários antígenos estudados foram denominados A — L — M e X.

Antígeno A — Obtido pela técnica de CERISOLA & col.⁵, a partir de um "pool" de amostras de culturas liofilizadas. Foi conservado à temperatura de -20°C. Para uso, após degelo, foi centrifugado a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos e isotonzado o sobrenadante. O teor de proteínas foi de 1780 microgramas/ml.

Antígeno L — Um grama de "pool" de amostras de culturas de *T. cruzi*, liofilizado, foi triturado em gral de vidro, adicionando-se 45,0 ml de butanol, conservado a 5°C e agitando-se em banho de gelo durante 30 minutos. O material foi centrifugado a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos a 0°C. Após decantação, a operação foi repetida com o sedimento. Em seguida, em banho de gelo, tratou-se o sedimento com 30,0 ml de acetona

mantida em "freezer" -20°C e centrifugou-se a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos, secando-se o resíduo em vácuo.

Ao pó adicionaram-se 100,0 ml de solução fisiológica 0,15 M, tratando por ultra-som 10 vezes durante um minuto, com intervalo de quatro minutos entre uma e outra sonização. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 r.p.m. durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi dializado contra NaCl 0,00015 M (quatro litros) durante 24 horas, com agitação. A concentração de proteínas foi de 1870 microgramas/ml. Para uso, diluímos até a concentração de 350 microgramas/ml de proteínas.

Antígeno M — Preparado a partir de culturas com predominância de formas epimastigotas. A delipidação foi realizada como na técnica de preparo do antígeno L e a concentração de proteínas padronizada em 350 microgramas/ml.

Antígeno X — Obtido pela técnica de CAMARGO & col.⁴, a partir de formas epimastigotas. Usou-se como extrator, solução de desoxicolato de sódio e com prévio tratamento por álcool-éter.

Dosagem de Proteínas — segundo LOWRY & col.¹³.

Hemaglutinação — Empregamos a técnica de CERISOLA & col.⁵, com as seguintes modificações: Ressuspendem-se os glóbulos taninizados e sensibilizados em solução fisiológica a 0,85% com 1% de soro de coelho, segundo NEAL & MILES¹⁵. Iniciamos pela diluição de 1:20.

Reação de Fixação do Complemento — Realizada com 50% de hemólise, pela técnica de FREITAS & ALMEIDA⁸.

RESULTADOS

Nos 70 soros de pacientes chagásicos, a RFC foi positiva em 65 (92,8%). Nos 32 soros de portadores de leishmaniose mucocuticular, a RFC para Chagas foi positiva em dois casos. Os demais resultados estão expostos nas Tabelas de I a V.

TABELA I

Comparação das atividades hemaglutinantes, expressas em títulos de soros, dos antígenos A, L, M e X, concentrados e na diluição-padrão de 40 microgramas por mililitro.

Concentração de proteínas (µg/ml)	A		L		M		X	
	1780	40	1870	40	350	40	1340	40
Soros n.º	Títulos dos soros							
1	10240	—*	1280	—	5120	—	2560	—
2	5120	—	5120	—	1280	—	2560	—
3	10240	—	2560	—	640	—	2560	—
4	5120	—	2560	—	2560	—	2560	—
5	5120	—	1280	—	5120	—	1280	—
6	5120	—	1280	—	640	—	2560	—
7	10240	—	2560	—	2560	—	2560	—
8	10240	—	1280	—	2560	—	2560	—
9	10240	—	1280	—	5120	—	2560	—
10	10240	—	1280	—	5120	—	2560	—
11	10240	—	2560	—	5120	—	2560	—
12	10240	—	1280	—	320	—	1280	—

* — : Não reagente

DISCUSSÃO

No presente trabalho, procuramos avaliar os principais antígenos hemaglutinantes relacionados na literatura, para o diagnóstico indireto da doença de Chagas. Assim, iniciamos pelo trabalho de CAMARGO & col.⁴ que relacionava a atividade hemaglutinante com a concentração em proteínas, concluindo que a sensibilidade ótima é conseguida quando o antígeno apresenta de 10 a 50 µg/ml de proteínas. Ao reproduzirmos esse trabalho, verificamos que os nossos dados foram discordantes no tocante à concentração de proteínas para se obter a sensibilização.

Analisando a Tabela I, verificamos em 12 soros que os antígenos A, L e M empregados neste estudo, e mesmo o antígeno X, preconizado por aqueles Autores, não apresentaram atividade hemaglutinante quando apresentavam a concentração de 40 µg/ml de proteínas.

Este fato levou-nos a estudar o teor de proteínas necessário ao aparecimento da atividade hemaglutinante.

Tomamos quatro soros e realizamos o THA (Teste de hemaglutinação) com os antígenos L e X, variando as concentrações de proteínas de acordo com a Tabela II. Obtivemos atividade a partir de 80 a 200 µg/ml com os antígenos L e X respectivamente. O antígeno L forneceu títulos idênticos àqueles obtidos com a concentração protéica original, ao atingirmos 300 µg/ml. Entretanto, com o antígeno X, os soros reproduziram os títulos originais quando nas concentrações de proteínas de 200 a 600 µg/ml.

O antígeno obtido por aqueles Autores, além da padronização em proteínas, é previamente tratado por álcool-éter. Procuramos verificar a influência dessa delipidação. Para isto, preparamos dois novos antígenos, sendo um submetido à purificação com álcool-éter. Realizamos o THA em 50 soros, empregando os dois antígenos. Os resultados estão expostos na Tabela III. Sua análise revela que o processo de delipidação empregado diminui a sensibilidade do antígeno.

TABELA II

Verificação da atividade hemaglutinante dos antígenos L e X, em função de sua concentração protéica

Concentração de proteínas (µg/ml)		ANTIGENO L														
		1870	40	80	120	160	200	250	300	350	400	450	500	550	600	
Soros n.º		Recíprocas das diluições														
	2	5120	—	640	1280	1280	1280	2560	5120	5120	5120	5120	5120	5120	5120	5120
	4	2560	—	640	1280	1280	1280	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	7	2560	—	1280	1280	1280	1280	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	11	2560	—	640	1280	1280	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
Concentração de proteínas (µg/ml)		ANTIGENO X														
		1340	40	80	120	160	200	250	300	350	400	450	500	550	600	
Soros n.º		Recíprocas das diluições														
	2	5120	—	—	—	—	80	320	320	1280	1280	1280	1280	1280	1280	5120
	4	2560	—	—	—	—	160	320	320	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	7	2560	—	—	—	—	320	1280	1280	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
	11	2560	—	—	—	—	320	640	1280	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560

BATISTA, S.M.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A. da; CHIARI, E. & PEREIRA, A.A.S. — Estudo de antígenos hemaglutinantes no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 16:317-323, 1974.

TABELA III

Número de soros reagentes em diferentes diluições, empregando-se o antígeno A, não tratado e após tratamento com álcool-éter, em 50 soros de portadores da doença de Chagas.

Recíproca das diluições dos soros	ANTÍGENO A			
	Não tratado		Após tratamento	
	N.º de soros reagentes	Porcentagem	N.º de soros reagentes	Porcentagem
20	50	100,0	47	94,0
40	50	100,0	47	94,0
80	50	100,0	47	94,0
160	50	100,0	46	92,0
320	50	100,0	40	80,0
640	44	88,0	36	72,0
1280	43	86,0	22	44,0
2560	35	70,0	6	12,0
5120	28	56,0	1	2,0
10240	18	36,0	—	0,0
Não reagente	—	0,0	3	6,0

TABELA IV

Resultados dos testes de hemaglutinação em 70 soros de indivíduos na fase crônica da doença de Chagas, com emprego dos antígenos A, L e M.

Recíproca das diluições dos soros	Porcentagens de soros reagentes		
	Antígeno A	Antígeno L	Antígeno M
20	100,0	100,0	100,0
40	100,0	100,0	100,0
80	100,0	100,0	100,0
160	100,0	100,0	100,0
320	100,0	94,3	94,3
640	100,0	90,0	84,2
1280	95,7	75,7	71,4
2560	87,1	64,3	60,0
5120	72,9	42,9	35,7
10240	54,3	17,1	14,3
20480	40,0	8,6	4,3
40960	32,9	7,1	0,0

TABELA V

Estudo da especificidade dos antígenos hemaglutinantes

Diagnóstico	N.º casos	Antígeno A		Antígeno L		Antígeno M	
		NR (*)	R (*)	NR	R	NR	R
Tuberculose pulmonar	15	15	—	15	—	15	—
L. muco-tegumentar	32	30	2	30	2	30	2
Calazar	20	20	—	20	—	20	—
Hanseníase lepromatosa	11	11	—	11	—	11	—

(*) R — reagente

(*) NR — não reagente

Na Tabela IV estão os resultados da prova de sensibilidade para os antígenos A, L e M empregando 70 soros de pacientes portadores de fase crônica da doença de Chagas. Observamos que o antígeno A, não delipidado, apresenta maior sensibilidade em relação aos antígenos delipidados L e M, a partir do título 1:320.

Na Tabela V, apresentamos o estudo da especificidade dos antígenos A, L e M. Não encontramos reações cruzadas com tuberculose pulmonar, hanseníase e calazar. Em 32 casos de leishmaniose muco-tegumentar, obtivemos dois soros com título de 1:320. Entretanto, estes apresentaram reação de fixação do complemento reativas para doença de Chagas, o que sugere a possibilidade de dupla infecção. Reações cruzadas no THA, com soros de portadores de leishmanioses, foram assinaladas por NEAL & MILES¹⁵ e CAMARCO & col.⁴. Os primeiros admitem a possibilidade de dupla infecção, mesmo não realizando a RFC para Chagas. Nossos resultados mais se aproximam daqueles obtidos por CERISOLA & col.⁵, que não encontraram reações cruzadas no THA, mesmo em casos de leishmanioses.

Dos antígenos estudados, melhores resultados foram obtidos com aquele proposto por CERISOLA & col.⁵, usando "pool" de amostras de *T. cruzi*.

Acreditamos que a delipidação pelo álcool-éter contribua para diminuir a sensibilidade do antígeno.

Quanto à concentração de proteínas para a padronização do antígeno, verificamos ser a mesma variável.

Julgamos que novos estudos devam ser realizados a fim de se estabelecer melhor relação entre proteínas e atividade hemaglutinante.

SUMMARY

A study of hemagglutinating antigens in the serological diagnosis of Chagas' disease

The Authors present the results of haemagglutination tests for the indirect diagnosis of Chagas' disease. Results obtained with antigens purified by alcohol-ether, acetone-butanol and with known protein contents were compared to those obtained with *T. cruzi* culture forms lysed in distilled water without further treatment. Serum samples were obtained from individuals with chronic Chagas' disease and positive xenodiagnosis. It was observed that the alcohol-ether treatment lowered the sensitivity of the antigen, and that the ratio between protein contents and agglutinating activity was variable and depended upon the antigen used. No cross specificity was observed with the antigen studied, in cases of Kala-Azar, leprosy and pulmonary tuberculosis. Of the 32 cases of muco-cutaneous leishmaniasis studied, only two — which also exhibited positive com-

plement fixation test for Chagas' disease — yielded positive reactions, suggesting a double-infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BATISTA, S.M. & SANTOS, U.F. — Antígeno metílico de cultura do *S. cruzi*. *Hospital* (Rio) 56:1045-1051, 1959.
2. BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 5:220-224, 1963.
3. CAMARGO, E.P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I — Origin of metacyclic tripanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:93-100, 1964.
4. CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S.; CORRÊA, N.S. & PERES, B.A. — Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:45-50, 1971.
5. CERISOLA, J.A.; ALVAREZ, M.; LUGONES, H.P. & REBOSOLAN, J.B. — Teste de hemaglutinação para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Med. Arg.* 49:1761-1767, 1962.
6. CERISOLA, J.A.; ALVAREZ, M.; LUGONES, J.P. & REBOSOLAN, J.B. — Sensibilidad de las reacciones sorológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasit.* 24:2-8, 1969.
7. CERISOLA, J.A.; MARTINI, G.J.W. de & ALVAREZ, M. — *Actualizaciones sobre enfermedad de Chagas n.º 2*. Instituto de Diagnóstico e Investigación de la enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben". Buenos Aires, Argentina, 1972.
8. FREITAS, J.L.P. de & ALMEIDA, J.O. de — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*. *Hospital* (Rio) 35:787-800, 1949.
9. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med.* 27:225-226, 1913.
10. KNIERIM, F. & SAAVEDRA, P. — Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico de las parasitosis (Nota práctica). *Bol. Chil. Parasit.* 21:39-44, 1966.
11. KNIERIM, F. & RUBINSTEIN, P. — The detection of Chagas' disease. A rapid haemagglutination test for special use in blood banks and epidemiological studies. *Vox Sang.* 18:280-286, 1970.
12. LOPES, E.R.; BATISTA, S.M.; CHAPADEIRO, E.; ALMEIDA, H.O.; ROCHA, A. & PIRES, J. — Estudo comparativo entre o teste de hemaglutinação e a reação de fixação do complemento no líquido pericárdico de chagásicos crônicos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:57-59, 1973.
13. LOWRY, O. H.; ROSEMBROUCH, N. J.; FARR, L. & RANDALL, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
14. MONTAÑO, G. & UCRÓS, H. — Comparación entre las reacciones de hemaglutinación y fijación del complemento en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasit.* 20:62-67, 1965.
15. NEAL, R.A. & MILES, R.A. — Indirect haemagglutination test for *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62:7, 1970.
16. ROMANA, C. — Aplicación del método de hemaglutinación al diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 37:73-76, 1961.
17. SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. et Biol.* 20:191-208, 1953.

Recebido para publicação em 23/1/1974.