

O USO DO *T. HASTATUS* COMO ANTÍGENO NAS REAÇÕES SOROLÓGICAS PARA DOENÇA DE CHAGAS.

William Barbosa *, Osvaldira Seabra de Oliveira e
Ana Cândido Czerewuta **

RESUMO

T. hastatus cultivados em LIT na fase de crescimento exponencial na forma de epimastigota, revelou-se excelente antígeno para reação de IFI para Doença de Chagas; assim também as formas amastigotas obtidas em culturas acelulares.

Os extratos solúveis daqueles cultivos também se comportaram bem nas reações de fixação do complemento (RFC) e imunodifusão em gel (ID) de maneira idêntica às cepas de *T. cruzi*, normalmente usadas na reação.

Os resultados aqui apresentados, representam a observação continuada e acumulada ao longo de 10 anos do emprego do *T. hastatus* como antígeno para Doença de Chagas.

UNITERMOS: Sorologia da Doença de Chagas, *T. "Cruzi-like"*, *T. Hastatus*.

INTRODUÇÃO

As reações sorológicas para o diagnóstico da Doença de Chagas, na sua fase crônica, estão relativamente, bem padronizadas, e os antígenos usados, habitualmente, provêm de uma das diversas cepas de *T. cruzi*, agente da doença (1, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 18, 33). Nas áreas endê-

mic, para confirmação diagnóstica e controle da doença, a reação de imunofluorescência indireta (IFI) usando os epimastigotas liofilizados, merece a preferência de quase todos (9, 11), o mesmo se pode dizer em relação aos inquéritos epidemiológicos, contudo se usa muito ainda a reação de fixação do complemento (RFC) com aquelas finalidades, cujos

* Prof. Titular do Depto. de Medicina Tropical do IPTESP. Responsável pela Unidade de Investigação Gaspar Viana.

** Profa. Assistente do Depto. de Medicina Tropical do IPTESP. Pesquisadora da Unidade de Investigação Gaspar Viana.

resultados costumam ser muito próximos dos da RIFI.

Como se sabe, a reação de fixação do complemento, a conhecida reação de Machado-Guerreiro, foi a primeira a ser usada, quase que rotineiramente, (14, 18, 25) até o advento da IFI (8, 9, 18, 19, 26, 33), embora desde cedo, Muniz tivesse feito amplas observações sobre o emprego de reação de precipitação e mostrasse a precocidade de seu aparecimento na fase aguda da doença, em detrimento à RFC que podia ser negativa naquela ocasião (22, 23, 24).

Logo, outras técnicas foram introduzidas na rotina clínica como a micro-técnica de RFC em placa de Almeida, a hemaglutinação (HA) (12, 13, 15, 20), a aglutinação de partículas (2, 17) e a ELISA.

Para o diagnóstico da doença congênita, a reação de aglutinação direta (AD), com dosagem específica de anticorpos IgM, pela quebra das ligações da molécula dessa imunoglobulina pelo 2-mercapto-etanol prevaleceu e é a conhecida reação de Vattuone (32).

No Brasil, quando do Inquérito Nacional sobre a prevalência da Doença de Chagas a reação de IFI foi a escolhida. A colheita de sangue foi feita através do papel de filtro que após diluído em botões de polietileno se constituiu no material para a reação. Esta conduta veio a ser revelar muito boa e correspondeu à expectativa dos executores do programa permitindo um rigoroso controle de qualidade pela comissão pertinente.

Foi a partir dessa época que ativamos nossas observações do *T. hastatus*, como antígeno para reações sorológicas na Doença de Chagas e essa comunicação

representa os resultados obtidos desde então com seu emprego.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno – O *Trypanosoma hastatus* proveio de dois isolados feitos em morcegos *Phyllostomus hastatus hastatus*, capturados na caverna do FERCAL, em Brasília, no ano de 1973 e 1975 – que foram mantidos, o primeiro em meio de Barrachini até sua perda e o segundo em meio LIT, em repiques quinzenais sucessivos, mantidos até hoje.

O Antígeno Particulado usado, constou sempre de epimastigota, que na fase exponencial de crescimento, ora usado liofilizado, ora simplesmente lavado em tampão e nele diluído na faixa de 10 elementos por campo de 400X. Experimentalmente e em comparação muitas vezes a forma amastigota obtida em cultura acelular e tripomastigota de *T. cruzi* e *T. hastatus* foram usadas em reações de imunofluorescência (6). Figs. 1 e 2.

O Antígeno solúvel se constituiu, quase sempre, do sobrenadante de massas de *T. hastatus*, predominantemente epimastigotas, rotos, por congelamento e descongelamento sucessivos, em água destilada ou tampão, e agitado com pérolas de vidro, por vezes era homogenizado no Virtis com alumina, sob banho de gelo e após centrifugada em centrífuga refrigerada a mais ou menos 10.000g.

Ultimamente, temos ensaiado o antígeno de glico-proteína de superfície obtido por extração em água destilada por passagem em álcool metílico e clorofórmio, por duas vezes e precipitado em álcool etílico, em geladeira a 4°C, por uma noite que após diálise é liofilizado (5).

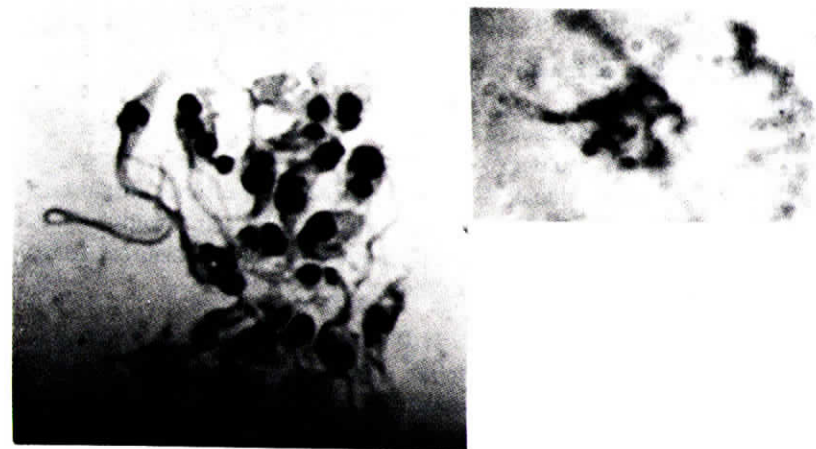


Fig. 1 – Formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura.



Fig. 2 – Formas amastigotas – desenho em câmara clara.

Técnicas de reações

IFI — A técnica clássica de imunofluorescência indireta.

RFC — A técnica foi padronizada segundo Almeida pelo método cinético para dosagem de complemento residual, fazendo-se a mistura sob duas condições — na primeira, a uma mistura de antígeno mais anticorpo, acrescentava-se o complemento; na outra, a uma mistura de antígeno mais complemento acrescentava-se o anticorpo.

Projetando-se em papel milimetrado comum, em ordenadas as unidades de complemento fixadas e em abscissas os tempos (em minutos) de incubação a 37°C correspondente a 50% de hemólise.

REAÇÃO DE PRECIPITAÇÃO EM GEL — Usou-se tanto a dupla difusão simples de Ouchterlony (DD) quanto a contra-imuno-elektroforese (CIE) clássicas.

RESULTADOS

Os resultados preliminares da reação de IFI realizados, inicialmente, em que usamos, paralelamente, o antígeno de *T. hastatus* e o *T. cruzi*, cepa Y contra 1081 soros humanos encontram-se na TABELA 1 e 2. É desta mesma época, os resultados de 93 soros de leishmanióticos, hansenianos e tuberculosos cujos resultados encontram-se na TABELA 2.

A reação de fixação de complemento não entrou na rotina, devido à facilidade da reação de IFI. Em um controle sobre 250 soros, em 1978, observados em comparação com a reação de IFI com o mesmo antígeno de *T. hastatus* houve

concordância quanto à positividade. Em outro grupo de 40 soros, além de 4 soros anticomplementares que não reagiram em FC houve 6 soros de pacientes sífilíticos que deram aparente reação cruzada, 4 com títulos de 2,4 unidades e 2 com 3,8 e 4,3 unidades, estes últimos foram também positivos no IFI com títulos 1/160 e 1/320, enquanto todos os outros foram negativos.

Destes estudos sobressairam as primeiras 1000 reações consecutivas comparativas feitas pela IFI em eluato de sangue colhidos em papel de filtro, cujos resultados foram superponíveis (6); o controle de rotina de nosso Serviço realizado ao longo de 2 anos em que os exames eram feitos em triplicata com os 2 antígenos *T. cruzi* e *T. hastatus*, sempre com resultados superponíveis e, finalmente, as 5.022 reações de rotina realizadas de 1978 a 1983 entre doentes atendidos pela Unidade Gaspar Viana, cujos resultados foram sempre compatíveis com os dados clínicos. (TABELA 3).

Também em trabalhos de cunho puramente de investigação, recentemente, verificamos, pela realização simultânea de IFI com antígeno de epimastigotos e amastigotos de *T. cruzi* e *T. hastatus* resultados, praticamente iguais. O que tem sido relatado também na literatura (3).

Devemos nos reportar aos resultados muito bons, observamos na imunodifusão em gel de agarose, que inclusive, deve ser repetida e incentivada pois ela detecta quantidades muito pequenas de anticorpos circulantes, servindo como exame de fácil execução, pouco custo, no controle da cura e na investigação da Doença de Chagas congênita.

TABELA 1: Estudo comparativo entre os antígenos de *T. hastatus* e *T. cruzi* na detecção de anticorpos contra *T. cruzi* em 1081 soros humanos

Material \ Resultados	Concordantes	Discordantes	Observações
150 soros em Papel de Filtro 1/20	150		24 horas de intervalo entre as reações
800 soros em Papel de Filtro 1/20, realizados concomitantemente.	795	2 positivos p/ <i>T. hastatus</i> e negativos p/ <i>T. cruzi</i> 3 positivos p/ <i>T. cruzi</i> e negativos p/ <i>T. hastatus</i>	Soros provenientes da Campanha Nacional Para Diagnóstico da Doença de Chagas, realizados no Laboratório do I.P.T.
Soros de 56 pacientes sabidamente chagásicos	Houve concordância absoluta de resultados, inclusive em títulos cuja variação não passaram de 1 diluição.		Pacientes sabidamente chagásicos de várias formas clínicas e exaustivamente estudados em várias reações sorológicas para Chagas.
75 soros testemunhos negativos	Concordância absoluta de resultados		Soros de pacientes de Zona não Endêmica, inclusive, Norte-americanos com exames realizados em vários laboratórios e por várias técnicas com resultados negativos.

TABELA 2: Pesquisa de reações cruzadas com antígenos de *T. cruzi* e *T. hastatus*, concomitantemente, em pacientes com leishmaniose, tuberculose e lepra

RESULTADOS SOROS	CONCORDANTES	POSITIVOS CONCORDANTES	NEGATIVOS CONCORDANTES	OBSERVAÇÕES
44 soros de pacientes leishmanióticos comprovados parasitologicamente	41/44	25	16	Das 25 reações positivas 16 foram até em títulos
24 soros de hansenianos	23/24	4	19	Possibilidade de Doença de Chagas pelo menos em 3 pacientes cujos títulos foram iguais ou superiores a 1/80.
25 soros de tuberculosos	25/25	5	20	

TABELA 3: Resultados de exames realizados na Unidade de Investigação Gaspar Viana de pacientes do Depto. de Medicina Tropical

ANOS	Nº DE REAÇÕES IF
1978	2.710
1979	415
1980	846
1981	86
1982	282
1983	683
TOTAL	5.022

COMENTÁRIOS

As reações de precipitações em gel usando o antígeno obtido por rotura de células, embora dessem resultados muito consistentes (7, 33), por tradição, não foram usadas de rotina no diagnóstico e controle da Doença de Chagas, senão em trabalhos experimentais — buscando comunidade antigênica com outros tripanosomatídeos (30) ou em pesquisa dirigida a comparar o *T. cruzi* ao *T. hastatus* — com este propósito, em 1979 e 1980, realizamos 200 reações de contra-imunoelectroforese (CIE) com bons resultados.

Atualmente, em 1985, realizamos a reação de soros de chagásicos e de soro de camundongos sensibilizados em *T. hastatus*, verificando reações positivas, inclusive com identidade antigênica, usando co-

mo antígeno a glicoproteína de superfície extraída do *T. hastatus* (5).

É evidente, que este antígeno glicoprotéico deverá se constituir em um antígeno muito promissor quanto à sua especificidade, não devendo dar reação cruzada com soros de leishmanióticos.

Em 1977, em trabalho realizado visando à padronização da reação de fixação do complemento usando o *T. hastatus*, foi investigado em primeira mão a influência da ordem de se misturar antígenos, anticorpos e complemento, utilizando o método cinético para dosagem do complemento residual (31).

Durante a padronização da reação de fixação do complemento observou-se a presença de reações catastróficas no sistema em estudo, o que significa que a ordem de se misturar os elementos da reação

afeta na quantidade de complemento fixado pelo complexo imune.

Quanto à imunodifusão em gel, os resultados apurados em rotina com 200 soros de chagásicos foram animadores, usando o antígeno obtido por congelamento e descongelamento. Com o antígeno constituído de glicoproteína de superfície, verificamos identidade antigênica entre o *T. cruzi* e o *T. hastatus*.

O *Trypanosoma hastatus*, em nossas mãos, demonstrou ser um excelente antígeno para reações sorológicas na Doença de Chagas, mostrando uma boa sensibilidade, boa reprodutividade e, relativamente, boa especificidade, dando as habituais reações de grupo; em resumo, comparativamente, se comportou como as cepas patogênicas de *T. cruzi*.

Esta afirmativa se deve aos resultados de comparação exaustiva, em reações paralelas, em elevado número, realizadas usando, concomitantemente, cepas bem conhecidas de *T. cruzi*, como a Y e obtendo-se resultados iguais ou com diferenças de títulos, insignificantes.

De já, o emprego do *T. hastatus* como antígeno para reações sorológicas na Doença de Chagas tem a vantagem de ser obtido de uma cepa do *T. cruzi*, não patogênica para animais de laboratório e provavelmente, para o homem, evitando-se assim, eventuais contaminações acidentais de laboratório. Acreditamos mesmo que dada a comunidade antigênica entre os trypanosomatídeos, pudéssemos até usar, como segurança, trypanosomatídeos de insetos para as reações sorológicas na Doença de Chagas. Por exemplo: *Herpetomonas pessoai* e *H. muscarum muscarum*. (4, 21, 27, 28, 29).

SUMMARY

Serologic reactions for Chaga's disease with antigens of *T. hastatus*.

Trypanosoma hastatus epimastigotes cultured in LIT media, were harvested in its exponential phase growth and used as antigens for American trypanosomiasis serological diagnosis by indirect immunofluorescence. It was demonstrated that was an excellent antigen for this purpose amastigotes also were used and prove to be as good as epimastigotes.

Soluble extracts were used for complement fixation and for immunodiffusion in gel, and results were similar to those observed with *T. cruzi* antigen.

Data reported here are the result of continued observations with *T. hastatus* antigen in Chaga's disease during the last ten years.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ALVAREZ, M.; CERISOLA, J. A. & ROHWEDDER, R. W. - Test de Immunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chile. Parasit., 23: 4-9, 1968.
- 02 - ANTHONY, R. L.; JOHNSON, C. M. & SOUZA, O. E. - Use of micro-ELISA for quantitating antibody to "Trypanosoma cruzi" and "Trypanosoma rangeli". Am. J. Trop. Med. Hyg., 28: 969-973, 1979.
- 03 - ARAÚJO, F. G. & GUPTILL, D. - Use of antigen preparations of the amastigote stage of "Trypanosoma cruzi" in the serology of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 33(3): 362-371, 1984.
- 04 - BARBOSA, W.; ALMEIDA, M.; ALVES, J. P. and SOUZA, M.E.M. - Imunologia da leishmaniose tegumentar americana. II. Imunofluorescência indireta com antígenos de "Leptomonas pessoais", "Leishmania brasiliensis," "Leishmania donovani" e "Trypanosoma cruzi", Rev. Pat. Trop. 1: 403-414, 1972.
- 05 - BARBOSA, W.; CZEREWUTA, A. & OLIVEIRA, O.S. de - Caracterização e identificação do "T. hastatus" ao "T. cruzi". Rev. Pat. Trop. 13 (3): 1984.
- 06 - BARBOSA, W.; OLIVEIRA, O. S. de & MACHADO, A. de J. - Tripanosoma de "Phyllostoma hastatus hastatus" como antígeno para detecção de anticorpos anti "T. cruzi" em humanos. Rev. Pat. Trop., 8(1-2): 35-44, 1979.
- 07 - BARBOSA, W.; PINHEIRO, Z.; LUZALVA, M.; CAMPOS, L. & OLIVEIRA, R. L. - Comparação da contra-immunoelectroforese com outros testes sorológicos no diagnóstico da infecção chagásica. Nota Prévia. Rev. Pat. Trop., 3(3): 263-268, 1974.
- 08 - BIAGI, F.; TAY, J. & MURRAY, R. M. - La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 57: 234-240, 1964.
- 09 - 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. S. Paulo, 8(5): 227-234, 1966.
- 10 - CAMARGO, M. E. - Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 6: 117-118, 1964.
- 11 - CAMARGO, M. E. - Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescence serological titrations. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 7: 19-20, 1965.
- 12 - CAMARGO, M. E.; HOSHINO, S. and SIQUEIRA, G. R. V. Hemagglutination with preserved sensitized cells: a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 15: 81-85, 1973.
- 13 - CERISOLA, J.A.; ALVAREZ, M.; BOCK, M. & WEGNER, D. - A comparison of a new antigen from amastigotes of *Trypanosoma cruzi* and an antigen from epimastigotes for the diagnosis of Chagas' disease by the indirect immunofluorescence test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 13: 162-166, 1971.
- 14 - CERISOLA, J. A.; ALVAREZ, M.; LUGONES, H. y RESOSOLÁN, J. B. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasit. 24: 2-8, 1969.
- 15 - CERISOLA, J. A.; FATALA CHABEN, M. y LÁZZARI, J. - Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Proc. VII Internat. Congr. Trop. Med. Malaria 2: 252-253, 1964.
- 16 - DUXBURY, R. E. & SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Amer. J. Trop. Med., 13: 525-529, 1964.
- 17 - ENGVALL, E. & PERLMANN, P. Enzymelinked immunosorbent assay. F. LISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled anti immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol., 109: 129-135, 1972.
- 18 - FIFE, E. H. & MUSCHIEL, L. H. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of "Trypanosoma cruzi" in fection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101: 540-543, 1959.

- 19 - GIROLA, R.; MARTINE, G. J.W. de & MILIC, A. - La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Segundas Jornadas Entomoepidem. arg., Salta, Argentina, 1965.
- 20 - LÁZZARI, J. - Test de hemaglutinación para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. II. Jorn. Entomoepid. Argent. 1: 209-210, 1965.
- 21 - LOPES, J. D.; CAULADA, Z.; BARBIERI, C. L. & CAMARGO, P. - Cross-reactivity between "Trypanosoma cruzi" and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30(6): 1183-1188, 1981.
- 22 - MAECKELT, G. A. - Diagnóstico de laboratorio de las Tripanosomiasis Americanas. Rev. Venez. Sanid. Asist. Soc. 29: 1-17, 1964.
- 23 - MUNIZ, J. & FREITAS, G. de - Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 41: 303-333, 1944.
- 24 - MUNIZ, A. & FREITAS, G. de - Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. Bras. Med. 60: 337-341, 1946.
- 25 - PEDREIRA DE FREITAS, J. L. - Reação de fixação do complemento para o diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. Arq. Hig. S. Paulo, 16: 55-94, 1951.
- 26 - SADUN, E. H.; DUXBURY, R. E.; WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. - Fluorescent antibody test for serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in man. J. Parasit. 49: 385-388, 1963.
- 27 - SANTOS, R.R.; AMATO NETO, V. & GIOIA, I. - Positividade de reações de fixação do complemento, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta, efetuadas com antígenos de "Leptomas pessoai" e soros de pacientes com doença de Chagas. Rev. Goiana Med., 21: 23-27, 1975.
- 28 - SOUZA, M. C.; REIS, A. P.; SILVA, W.D. & BRENER, Z. - Mechanism of acquired immunity induced by "Leptomonas pessoai" against "Trypanosoma cruzi" in mice. J. Protozool., 21: 579-584, 1974.
- 29 - SOUZA, M.C. & ROITMAN, I. - Protective effect of "Leptomonas pessoai" against the infection of mice by "Trypanosoma cruzi". Rev. Inst. Microbiol., 2: 187-189, 1971.
- 30 - SOUZA, M. C. M. & BARBOSA, W. - Immunological relationship between "Leptomonas pessoai" (strain "principis"; "Crithidia fasciculata; Leishmania brasiliensis" and "T. cruzi" by the agar gel diffusion technique. Previous note. Rev. Pat. Trop., 1(4): 415-419, 1972.
- 31 - SOUZA, M. C. M.; BARBOSA, W. & SOUZA, J. H. - Padronização da reação de R.F.C. para Doença de Chagas com "T. hastatus". II Jornada Goiana de Pesquisadores, 1978.
- 32 - VATTUONE, N. H. & YANOVSKY, J. F. - Agglutination activity of enzyme treated epimastigotes of Trypanosoma cruzi". Exp. Parasit., 30: 339-345, 1971.
- 33 - VOLLER, A. - Immunofluorescent observations of "Trypanosoma cruzi" Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 57: 232, 1963.