

## USO COMPARATIVO DE AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* E *T. HASTATUS* CULTIVADOS A 35°C EM MEIOS SEM CÉLULAS NA RIFI PARA DOENÇAS DE CHAGAS.\*

Osvaldira Seabra de Oliveira \*\*, William Barbosa \*\*\*, Ana Cândido Czerewuta \*\*\*\*  
Joana Rosa de Mendonça \*\*\*\*\*

---

### RESUMO

Amastigotas obtidos de cultura de 5 dias em meio RPMI complementado com 30% de soro de galinha a 35° C e Epimastigotas crescidos por 5 dias em meio LIT a 26° C de *Trypanosoma cruzi* e de *Trypanosoma "cruzi-like"* de *P. hastatus hastatus* (denominado provisoriamente como *T. hastatus*) foram empregados na reação clássica de imunofluorescência indireta (RIFI) de 36 soros de pacientes clinicamente chagásicos, sorologicamente reatores e dois deles, parasitologicamente, comprovados e de 10 soros de pacientes não reatores e clinicamente sadios. Os resultados foram analisados tanto em relação ao antígeno empregado quanto à sua forma. Verificou-se haver, praticamente, resultados iguais quanto à reciprocidade dos títulos das reações, sensibilidade e especificidade com ambos os antígenos e formas. Todavia a natureza da fluorescência era muito mais nítida com o antígeno da forma epimastigota, enquanto que a forma amastigota era menos intensa e não havia gradação em relação aos títulos, tornando-se negativa quase bruscamente.

---

UNITERMOS: *T. cruzi* e *T. hastatus*; Reação de Imunofluorescência indireta – RIFI.

### INTRODUÇÃO:

Desde 1959 vem sendo usada a reação de imunofluorescência (IF) para Doença de Chagas (14), embora realizada em tubo, àquela época se mostrou capaz de se comportar como as técnicas de fixa-

ção de complemento. A partir de 1963 Voller introduziu a técnica com o antígeno fixado em lâminas, usando como elementos figurados as formas de cultura, predominantemente epimastigota (19), a partir daí surgiu um trabalho usando as formas de Leishmanias do miocárdio do

---

\* Trabalho realizado com ajuda parcial da COPERCOPE

\*\* Prof. Assistente do Depto. Med. Tropical – IPT/UFG.

\*\*\* Prof. Titular do Depto. Med. Tropical – IPT/UFG

\*\*\*\* Prof. Assistente do Depto. Med. Tropical – IPT/UFG.

\*\*\*\*\* Técnica de Laboratório do Depto. Med. Tropical-IPT/UFG.

rato infectado — Biagi, Tay e Murray (1964) — com resultados concordantes com a RFC (7).

Em 1965 e 1966 surgiram respectivamente, os trabalhos de Girola, Martine e Milic com a técnica em lâminas e tripanosomas de cultura, com 96% de concordância com a RFC (15); Camargo (1966) usando Trypanosomas de cultivo, epimastigota formolizado em 494 soros não reatores e 48 reatores (10). Em 1968, Alvarez, Cerisola & Rohwedder estudaram 1083 soros por IF comparando com RFC e hemaglutinação (11), usaram epimastigotas com 2 a 4 dias de cultivo para a reação de IF colhidos em solução salina formolizada a 0,1 % e fixadas em lâminas pelo calor suave, ventiladas e fixadas com álcool metílico ou acetona. A IFI foi concordante com 240/241 soros positivos para RFC e RHA; com 610/610 reações negativas para RFC e RHA, com 240/241 reações positivas. Em 1974 Barbosa e cols, estudando a contra-imuno-eletroforese na doença de chagas, verificaram em 10 pacientes chagásicos a concordância da IFI com RFC, HA e CIE (6).

Nesta primeira fase desses estudos ficou evidenciado que a RFC, era uma reação bastante sensível e confiável, altamente reprodutível no diagnóstico da Doença de Chagas, pecando apenas pela exigência da obtenção de um bom antígeno, realmente, padronizado, quando os resultados eram bastante próximos aos da RIFI.

Desde então também ficou claro que o elemento figurado na reação de IF, tanto pode ser a forma de cultivo, quanto a forma amastigota tissular. Posteriormente, apareceram outros trabalhos em que além do *T. cruzi*, foi usado *T. de morcego*, *P. hastatus hastatus* ou *Herpetomo-*

*nas pessoai* (5,18), todos com resultado no diagnóstico da infecção ou doença.

Por ser a forma amastigota intracelular aquela habitualmente encontrada nos vertebrados, parecia lógico que esta forma fosse um melhor antígeno particulado para IF.

Em recente trabalho Araújo & Gup-till estudaram antígenos derivados de amastigotas ou de estágio epimastigota preparados por sonicação ou formolização que foram comparados pela técnica de anticorpos imunofluorescentes IFA e pelo teste de enzimas ligados a imunoabsorventes (ELISA) para a detecção de anticorpos do parasita em soro de homens infectados. Os resultados revelaram que os antígenos derivados de amastigotas de culturas de células podem ser usados para detecção de anticorpos de *T. cruzi* em ambos os testes. Além disso a quantidade de antígenos obtidos de preparados de amastigotas precipitados por anticorpos em 6 de 10 soros examinados foram maiores que dos epimastigotas dos mesmos soros, em 2 foram iguais e em 2 predominaram nos epimastigotas (2).

#### MATERIAL E MÉTODOS;

Foram estudados 36 soros de pacientes sabidamente chagásicos reatores para Tripanosomíase americana, através de outras reações sorológicas e 10 soros negativos (não reatores) investigados também por outras reações, sem o prévio conhecimento daqueles resultados.

Os antígenos empregados foram as formas epimastigotas de *T. cruzi* e *Trypanosoma de morcego* — *P. hastatus hastatus*, (crescidos em meio LIT à temperatura de 26°C e a forma "amastigóide", dos mesmos parasitas crescidos em meio RPMI + soro de galinha a 35°C.

A reação empregada de IFI foi a clássica padronizada por Camargo (8), usando a diluição máxima do soro a 1 : 2560.

reação máxima de até uma diluição e não concordantes acima dessa variação. Não houve discordância em relação a soros não reativos e os resultados encontram-se resumidos na TABELA I.

#### RESULTADOS:

Os resultados foram considerados concordantes, positivos quando havia va-

TABELA 1: Número e distribuição de soros de acordo com os títulos de anticorpos fluorescentes em testes realizados com antígeno amastigota ou epimastigota de *T. cruzi* e trypanosoma de *P. hastatus hastatus*

AMASTIGOTA	R E C I P R O C A D O S T Í T U L O S														
	E P I M A S T I G O T A						T R I P A N O S O M A D E M O R C E G O								
	40		80		160		320		640		2560		TOTAL		
Th	Tc	Th	Tc	Th	Tc	Th	Tc	Th	Tc	Th	Tc	Th	Tc		
40	1	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	
80	-	-	2	3	2	-	1	1	-	-	-	-	-	4	5
160	1	-	-	1	-	2	3	1	2	-	-	-	-	5	5
320	-	-	-	-	-	2	2	10	5	-	-	-	-	12	8
640	-	-	-	-	-	1	1	6	8	4	3	-	-	11	13
1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1
N°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10
TOTAL	2	2	2	4	4	3	5	7	18	15	4	5	1	46	46

N° = Negativo  
Th = T. de *hastatus hastatus*  
Tc = T. *cruzi*

## COMENTÁRIOS:

A preocupação do emprego, como antígenos das formas do *Tripanosomatídeo* que ocorre no homem, não se restringe, exclusivamente ao *Tripanosoma* na Doença de Chagas, ela também se estende às leishmanioses, em que alguns trabalhos já trataram do assunto (3,4,13 e 17).

Na Doença de Chagas, a maioria dos testes sorológicos, são realizados com a forma de epimastigota de cultura e elas gozaram de elevados índices de especificidade e sensibilidade (5, 7, 8, 9, 10, 11, e 15) e são pouquíssimos os trabalhos que empregaram a forma amastigota na investigação sorológica com finalidade diagnóstica (7,2). Tudo parece indicar que a forma epimastigota de cultura contém os componentes antigênicos específicos do *T. cruzi*, aliás, o que recentemente foi demonstrado por Orozco & cols. em estudo sobre anticorpos monoclonais contra o componente 5 específico para *T. cruzi* (16).

## SUMMARY:

**Use of forme amastigote of *T. Cruzi*, from cultures medium free of cells at 37° C, for IFR in chagas' disease.**

Amastigotes obtained from 5 days of culture in RPMI complemented with 30% of chicken serum at 26° C and Epimastigotes grown for 5 days in LIT culture at 26° C of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma "cruzi-like"* of *Phyllostomus hastatus hastatus* (temporary denominated *T. hastatus*) were used on the classic reaction of indirect immunofluores-

cence (RIFI) 36 serum of patients clinically chagasics, serum reactors and two of them, parasitologically confirmed and 10 serum of non reactor patients and clinically healthy.

The results were analysed as much in relation to the antigens used as to its shape. It was verified that practically, equal results according to the reciprocity of the reactions titles, sensibilities, and specificity of both antigens and shape.

Although, the nature of the immunofluorescence was much more clear with the antigen of the epimastigote form while the amastigote form was less intense and there was no graduation between the titles and it became negative almost brusque.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 01 - ALVAREZ, M.; CERISOLA, J. A. & RO-WHEDDER, R.W. - Test de immunofluorescência para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chile. Parasit.*, 23: 4-9, 1968.
- 02 - 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.
- 03 - BADARÓ, R.; REED, G.; STEWE & CARVALHO, M. EDGAR. - Immunofluorescent antibody test in American Visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two leishmania species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32(3): 480-484, 1983.
- 04 - BARBOSA, W.; OLIVEIRA, O.S.; CZE-REWUTA, A.C. & MENDONÇA, J.R. - Estudo comparativo da técnica de imunofluorescência indireta na Leishmaniose tegumentar com as formas promastigotas e amastigotas de "*L. brasiliensis brasiliensis*". III Jornada Goiana de Pesquisadores - *Rev. Pat. Trop.* 8(1-2): 35-44, 1979.
- 05 - BARBOSA, W.; OLIVEIRA, O.S.; MACHADO, A.J. - *Tripanosoma de "Phyllostoma hastatus hastatus"* como antígeno para detecção de anticorpos anti "*T. Cruzi*" em humanos. *Rev. Pat. Trop.* 8(1-2): 35-36, 1979.
- 06 - BARBOSA, W.; PINHEIRO, Z.B.; CAMPOS, M.L.L.; OLIVEIRA, R.L. - Comparação da contra-immunoeletoforese com outros testes sorológicos no diagnóstico da infecção chagásica. *Nota Prévia. Rev. Pat. Trop.*, 3(3): 263-268, 1974.
- 07 - BIAGI, F.; TAY, J. & MURRAY, R.M. - La reacción de inmunofluorescencia en diagnóstico de la enfermedad de chagas. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* 57: 234-240, 1964.
- 08 - CAMARGO, M.E. - Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 117-118, 1964.
- 09 - CAMARGO, M.E. - Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescent serological titrations. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 7: 39-40, 1965.
- 10 - CAMARGO, M.E. - Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modifications employing preserved culture forms of "*Trypanosoma cruzi*" in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8: 227-234, 1966.
- 11 - 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: 163-166, 1971.
- 12 - DUXBURY, R. E. & SAIDUN, F. H. - Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Amer. J. Trop. Med.*, 13: 525-529, 1964.
- 13 - DVORAK, J.A. et al. - "*Trypanosoma cruzi*": interacción with vertebrate cells in vitro. IV Environmental temperature effects. *Exp. Parasitol.*, 36: 150-157, 1974.
- 14 - FIFE, JR. E.H. & MUSCHEL, L.H. - Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of "*Trypanosoma cruzi*" infections. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 101: 540-543, 1959.
- 15 - GIROLA, R.A.; MARTINI, G.J.W. & MILLIC, A. - La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Mazza. II Jorn. Entomoepid. Argent.*, 1: 187-192, 1965.
- 16 - OROZCO, O.; AFCHAIN, D.; DISSOUS, C.; RODRIGUES, C.; OVLAQUE, G.; LEMESRE, L.J.; LOYENS, M. & CAPRON, A. - Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for "*Trypanosoma cruzi*". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(4): 560-568, 1984.
- 17 - PAPPAS, M.G.; MACGREEVY, P.B.; HAJKOWSKI, R.; HENDRICKS, L.D.; OSTER, N.C. & HOCKMEYER, T.W. - Evaluation of promastigote and amastigote antigens in the indirect fluorescent antibody test for American cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Med. Hyg.*, 32(6): 1260-1267, 1983.
- 18 - RIBEIRO, R.S.; MENEZES, H. & AMATO, V.N. - Diagnóstico sorológico da doença de Chagas usando antígeno de "*Leptomonas pessoai*". IX Congresso Soc. Bras. Med. Trop. - Resumo, 145

19 - VOLLER, A. - Immunofluorescent observation on "*Trypanosoma cruzi*".

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 57: 232, 1963.