

COMPARAÇÃO DA CONTRA-IMUNOELETROFORESE COM OUTROS TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO CHAGÁSICA. NOTA PRÉVIA *

WILLIAM BARBOSA ** ZAIR PINHEIRO *** MARÍA LUZÁLVA
LÓCIO CAMPOS **** RAQUEL LOPES DE OLIVEIRA *****

RESUMO

Os resultados da análise, através da reação de contra-imunoelectroforese (CIEF), de cento e cinquenta e quatro sôros de indivíduos portadores de infecção chagásica, comprovada, parasitológica e clinicamente, foram comparados com outros testes sorológicos como a reação de fixação de complemento (RFC), hemaglutinação indireta (HI) e Imunofluorescência (IF).

Os soros foram enquadrados em quatro grupos distintos e os dados comparativos obtidos em três grupos foram concordantes. Apenas no segundo grupo (Grupo B) os resultados encontrados para a reação de contra-imunoelectroforese não foram inteiramente compatíveis com os da reação de fixação de complemento.

Embora os dados do citado grupo tenham sido um tanto discrepantes, acreditamos que, de um modo geral, os resultados obtidos demonstram a possibilidade do aprimoramento da técnica e a possível eventualidade do seu emprego no diagnóstico da infecção chagásica. Ficou, entretanto, seguramente evidenciado que a reação

de CIEF é capaz de detectar pequenas concentrações de precipitinas em pacientes chagásicos crônicos e em evolução, em recém nascidos cujos anticorpos atravessaram a barreira placentária e mesmo em portadores da infecção chagásica, sem doença.

INTRODUÇÃO

As reações de precipitação não têm sido usadas, habitualmente, no estudo da doença de Chagas. Admitia-se que as precipitinas circulantes só fossem encontradas consistentemente na fase aguda da doença. Ainda que o método da dupla difusão em gel de ágar seja usado com relativa frequência em trabalhos de investigação sobre trypanosomatídeos, incluindo o **T. cruzi** ^{2,7,8,12,14,15}, muitos poucos trabalhos apareceram sobre sua aplicação no estudo desta doença, valendo ressaltar o de Muniz ¹¹, e recentemente, o de Afchain e

* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical, realizado com recursos financeiros do CNPq.
** Chefe do Departamento de Medicina Tropical.
*** Prof^a. Auxiliar de Ensino do Departamento de Parasitologia.
**** Prof^a. Auxiliar de Ensino do Departamento de Microbiologia.
***** Técnica de Laboratório do IPT.

cols.¹, que por análise imunoeletrorética de um extrato solúvel de *T. cruzi* demonstraram a presença de anticorpos precipitantes (até nove precipitinas séricas) em sôros de pacientes com doença de Chagas.

A contra-imunoeletrorforese é uma técnica de imunodifusão que vem, dia a dia, ganhando os foros de eleição e, sendo experimentada, largamente, seja em doenças à virus, doenças bacterianas, seja nas produzidas por fungos e protozoários^{3,4,6,9,10,13,17}, graças à simplicidade do teste, a rapidez da obtenção dos resultados e sua sensibilidade que é dez vezes maior que as outras técnicas de imunodifusão.

O propósito deste trabalho é verificar a potencialidade do emprego da reação de contra-imunoeletrorforese (CIEF) no estudo da doença de Chagas, comparando-a com os testes clássicos de Reação de fixação de complemento (RFC) em placa, Hemaglutinação e imunofluorescência, objetivando, principalmente, avaliar a sua sensibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno:

Trypanosoma cruzi, cêpa, Y, mantida no Instituto de Patologia Tropical da UFGO., foi cultivado em manga de diálise mergulhada em meio de carvão de sangue humano ou bovino, enriquecido com peptona e glicose, ou meio LIT. Os tripanosomas após dez dias foram retirados da cultura, lavados seis a sete vezes em salina tamponada. Após centrifugações sucessivas, o sedimento foi res-

suspensão na mesma solução em volume adequado e rôtos por congelamento e descongelamento repetidos. Após as centrifugações desprezava-se o sedimento. O sobrenadante era usado como antígeno. Seu conteúdo proteico era determinado pela técnica de Lowry, e variou de partida para partida em torno de 1.85 a 3.40 mg/ml. O antígeno era distribuído em pequenas alíquotas e guardado em "freezer" a -20°C; quando em uso era conservado a 4°C.

Sôros:

Os sôros estudados constaram de quatro grupos:

Grupo A — Sôros de dez pacientes chagásicos, oito de forma crônica e dois de forma indeterminada, com títulos conhecidos de hemaglutininas e anticorpos fluorescentes, e com reação de fixação de complemento em placa positiva.

Grupo B — Sôros de 84 pacientes chagásicos comprovados clínica e parasitologicamente, e também pelas reações de fixação de complemento e, quarenta analisados também pela hemaglutinação.

Grupo C — Sôros de sessenta gestantes colhidos ao acaso que foram submetidos paralelamente à reação de fixação de complemento e à contra-imunoeletrorforese. Dentre estes sessenta sôros constataram dezessete pares de sôros de mãe e feto.

Grupo D — Constituído de vinte sôros testemunhas em que se incluíram cinco sôros de outras doenças e dois sôros positivos na Reação de Fixação de complemento, mais treze sôros de pessoas normais, com sôros não re-

agentes na RFC, para doença de Chagas.

Técnicas:

A contra-imunoeletrorforese foi realizada em lâminas de 25 x 75 mm, segundo os moldes adotados e, previamente descritos para B.S.A.³ e Calazar^{4,13}.

Os outros testes sorológicos foram realizados pelas técnicas de Imunofluorescência indireta — técnica de Camargo⁵; reação de

fixação de complemento — microtécnica em placas, de Almeida e Hemaglutinação — técnica de Camargo, em experimentação.

Na reação de contra-imunoeletrorforese os sôros foram inicialmente testados, sem diluir, e posteriormente diluídos até 1:64.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos quatro grupos estudados constam das Tabelas I, II, III e IV.

TABELA I

Resultado das reações comparativas do grupo A — 10 pacientes de doença de Chagas.

Identificação	H F	R F C	I F	C I E F	Forma clínica
AAS — 84811	160	R	160	Neg.	Crônica digestiva
JAS — 137226	160	R	80	Pos.	ME* crônica digestiva
GPM — JA. 1	160	R	20	Pos.	ME crônica digestiva
ODB — AR. 2	320	R	20	Pos.	Crônica digestiva
ABS — AR. 3	160	R	40	Pos.	Indeterminado
JRQ — AR. 4	40	R	80	Pos.	Crônica cardíaca
HFS — AR. 5	320	R	40	1/4	Indeterminado
BJV — 110352	80	R	80	Pos.	Crônica cardíaca
AAO — SR. 1	320	R	80	Pos.	Crônica cardíaca
ANS — 34439	640	R	160	1/2	Crônica digestiva

* — Megaesôfago

TABELA II

Grupo B — Resultado comparativo de 84 soros de chagásico pela Reação de Fixação do complemento (RFC) Contra - imunoeletrorforese (CIEF).

Reações Nº. de soros	R F C		C I E F	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
84	84	0	43	41

TABELA III

Grupo C — Estudo comparativo da reação de (contra-imunoeletroforese) com a (Reação de Fixação do Complemento (R.F.C.) em 60 soros de rotina para diagnóstico; gestantes, parturientes e fetos.

Reações Nº. de soro	R F C		R C I E F	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
60	52	8	54	6*

* — Os soros positivos em R C I E F são concordantes com os de R F C.

TABELA IV

Grupo D — Quadro comparativo dos quatro grupos estudados.

Reações Nº. de soros	R F C		C I E F	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
10 soros	10	0	9	1
D. Chagas 84	84	0	43	41
Soros de rotina 60	8	52	6	54
Outras doenças e sádios 20*	2	18	2	18

* — 2 Soros chagásicos

COMENTÁRIOS

Baseados nos resultados obtidos pelas reações de fixação de

complemento, imunofluorescência e hemaglutinação, pudemos constatar a especificidade da reação de contra-imunoeletroforese, a

qual não revelou nenhum teste falso positivo.

Dentre os dez sôros de pacientes chagásicos com reações de hemaglutinação, fixação de complemento e imunofluorescência, nove deram resultados concordantes na contra-imunoeletroforese, um diluído a 1/2 e outro a 1/4. Parece entretanto, não haver correlação entre os títulos das reações de IF e HI com os da CIEF. Paciente positivo cuja recíproca de títulos era de 1/160 em IF e HI foi negativo na CIEF, quando diluído.

As reações de oitenta e quatro sôros de pacientes chagásicos constantes do grupo B e analisados apenas qualitativamente demonstrou uma evidente diferença de sensibilidade entre as reações clássicas de fixação de complemento em relação à CIEF. Enquanto aquelas detectaram anticorpos em 84 sôros, a CIEF o fez em apenas 43, demonstrando apenas 43% de positividade.

No grupo C, entretanto, os sôros de gestantes, parturientes e fetos estudados paralelamente revelaram resultados concordantes nas reações de fixação de complemento e contra-imunoeletroforese. Dos sessenta sôros testados oito foram positivos pela RFC e seis destes pela CIEF.

No grupo D, os dados obtidos em ambas as reações foram inteiramente concordantes.

Embora os resultados obtidos no grupo B sejam realmente discrepantes, acreditamos que um aperfeiçoamento da técnica, levando em consideração o perfeito equilíbrio na concentração antígeno-anticorpo, é possível de ser

levado a efeito, uma vez que como, pudemos observar, a reação é capaz de detectar pequenas concentrações de precipitinas em pacientes chagásicos crônicos e em evolução, de recém-nascidos cujos anticorpos atravessaram a barreira placentária e mesmo em portadores de infecção chagásica, sem doença.

SUMMARY

Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in the Diagnosis of Chagas' disease.

154 sera from patients with confirmed Chagas' disease have been tested by counterimmunoelectrophoresis (CIEF). The results of this reaction was compared with other serologic test as hemagglutination, fluorescent antibody test and complement fixation reaction in plates, in regard to sensitivity, specificity and its use to study Chagas' disease.

The data obtained not were satisfactory completely; but this reaction can be used to detect little concentrations of circulating precipitins in chagasic patients, in babies and in asymptomatic chagasic.

BIBLIOGRAFIA

1. AFCHAIN, D.; CARPRON, A. & PRATA, A. — Les anticorps precipitants dans la Trypanosomiase americane humaine. *Gaz. Med. Bahia*, (3), 1970.
2. AFCHAIN, D.; CAPRON, A. & JARDIN, J. Analyse antigenique comparée, par immunoelectroforese des formes des clutures de *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania donovani*. Consequences philogeniques et diagnostiques. *The society of Protozoologists Abstracts*.
3. BARBOSA, W.; BLAU, E.; MENDONÇA, J. R. & OLIVEIRA, R. L. — Crossingover immunoelectrophoresis applied to study of immunology of south American Blastomycosis — Prelous Note. *Rev. Pat. Trop.* (2): 1, 73-76, 1973.
4. BARBOSA, W.; PINHEIRO, Z. B. & OLIVEIRA, R. L. — Eletroimunodifusão no diagnóstico do Cultuzar com mi-

- tipos de *L. donovani*, *L. brasiliensis* e *L. pessoai*. Resultados preliminares. Rev. Pat. Trop. (2): 4, 377-386, 1973.
5. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the sera diagnosis of american Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop., 8 (3): 227-234, 1966.
 6. DESPOMMIER, D.; MULLER, M.; JENKES, B. & FRUITSTONE, M. — Immunodiagnosis of human trichinosis using counterimmunoelectrophoresis and agar gel diffusion techniques. The Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg. 23 (1): 41-44, 1973.
 7. DUPOSSEY, P. & MARECHEL, J. — Structure antigenique des Trypanosomes. Etude des antigenes de trois espèces de Trypanosomes (*T. mega*, *T. cruzi*, et *T. gambiense*) par la fixation du complement, la precipitation en gel et l'immunofluorescence. Ann. de l'Inst. Pasteur. 110: 889-911, 1966.
 8. GARCIA, W.; OCLERICH, S. & MULLER, H. — Relaciones inmunológicas entre *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma lewisi*. — Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo. 11 (2): 67-70, 1969.
 9. HIERHOLZER, J. C. & BARNE, M. — Counterimmunoelectrophoresis with adenovirus type specific anti-hemagglutinin sera as a rapid diagnostic method. The Jour. of Immun. 112 (3): 987-995, 1974.
 10. KRUPP, I. M. — Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in the diagnosis of amebiasis. The Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg. 23 (1): 27-30, 1973.
 11. MUNIZ, J. — Contribuição para um melhor conhecimento da ação patogênica do *Schizotrypanosoma cruzi* no organismo humano. Hosp. Rio de Janeiro, 72: 675, 1967.
 12. NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L. M. & KLATZEL, J. — Differentiation on antigenic constitution of strains of *T. cruzi*. Expr Parasit. 14: 221-232, 1963.
 13. PINHEIRO, Z. B.; OLIVEIRA, O. S. & BARBOSA, W. — Reações de imunoprecipitação em gel aplicadas ao estudo do Calazar. Rev. Pat. Trop. (3), 2: 153-170, 1974.
 14. PIZZI, P. T.; RUBIO, D. M. & KNIE-RIM, T. F. — Contribution de los mecanismos inmunitarios en la enfermedad de Chagas experimental de la rata. Bol. Inf. Parasit. Chilenas, 8: 66-72, 1953.
 15. SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLI, J. F. & CARVALHEIRO, J. R. — Um antígeno solúvel presente no soro de ratos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Nota prévia. Rev. Inst. de Med. Trop. São Paulo. 8: (3): 148-149, 1960.
 16. SOUSA, 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.
 17. TORRES, J. M.; GRISANTES, J. A.; GRY MUND, Saude. 119-126, 1973. & YARZABAL, L. A. — Contribution la Eletrosinérise al diagnostico inmunológico de la Hidatidosis. Bol. de la