

## XENODIAGNÓSTICO, HEMOCULTURA E TESTE DE LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO, COMO CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS PARA QUIMIOTERAPIA

Vera Lucia PEREIRA, Antonio Marcos de A. LEVY & Elias BOAINAIN

### RESUMO

O tratamento etiológico da doença de Chagas é iniciado geralmente apenas quando se dispõe de um diagnóstico parasitológico positivo. Na tentativa de aumentar o número de candidatos assim selecionados para o tratamento específico, estudamos 36 pacientes chagásicos crônicos associando o xenodiagnóstico, a hemocultura e o teste de lise mediada pelo complemento, em duas séries sucessivas, intercaladas de um mínimo de 60 dias. A sensibilidade do xenodiagnóstico e da hemocultura foi respectivamente de 30,5% e de 8,3% na primeira série e de 36,1% e de 19,4% nas duas séries.

Foram positivos, em pelo menos uma das duas provas, 17 (47,2%) dos pacientes. Destes, entretanto, somente 9 (53,0%) mostraram teste de lise constantemente positivo enquanto que em 5 (29,4%) o teste foi negativo e 3 (17,6%) apresentaram resultados ora positivos, ora negativos. Nos pacientes com provas parasitológicas negativas, o teste de lise foi positivo em 4 (15,8%), negativo em 9 (47,4%) e discordante em 6 (31,5%). Assim, o teste de lise mediada pelo complemento não se constitui em bom método de triagem de candidatos ao tratamento. Apesar da baixa sensibilidade, as provas parasitológicas ainda constituem o instrumento mais seguro para o clínico.

**UNITERMOS:** Doença de Chagas; Testes para a seleção de pacientes crônicos ao tratamento específico.

### INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes critérios para a seleção de pacientes chagásicos crônicos para o tratamento etiológico é a evidência de **Trypanosoma cruzi** na circulação sanguínea. O encontro do parasita antes do tratamento e o seu desaparecimento após o mesmo comprovam a eficiência da quimioterapia.

Em pacientes com infecção chagásica aguda, a comprovação da parasitemia é feita por

métodos diretos de relativa simplicidade, pois o número de parasitas quase sempre é elevado. Na fase crônica da infecção, entretanto, a parasitemia geralmente é baixa e residual, tornando-se de difícil detecção. Neste caso, recorre-se a métodos indiretos, como o xenodiagnóstico e a hemocultura, para a amplificação do número de parasitas.

Em 1979, KRETTLI et al.<sup>10</sup> introduziram

o teste de lise mediada pelo complemento. Este teste poderia detectar anticorpos presentes em pacientes portadores de infecção ativa, sendo um marcador indireto da presença de tripomastigotas.

Nosso interesse é selecionar um maior número de pacientes chagásicos crônicos para as tentativas de tratamento etiológico. O objetivo do presente estudo foi verificar se a lise mediada pelo complemento associada às provas parasitológicas, bem como a realização mais frequente destes testes, poderiam contribuir para a elevação do número de candidatos ao tratamento específico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 — Pacientes

Foram selecionados trinta e seis pacientes chagásicos crônicos, com diagnóstico confirmado através das provas sorológicas (reações de fixação de complemento, hemaglutinação indireta com 2-mercaptoetanol, aglutinação direta com 2-mercaptoetanol e imunofluorescência indireta anti-IgG). Os pacientes encontravam-se na forma indeterminada da doença, diagnosticados através de exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos. Todos eram do sexo masculino, com idade não superior a 40 anos e com domicílio na Grande São Paulo. Cada paciente foi submetido a duas séries de testes, que compreenderam o xenodiagnóstico, a hemocultura e a lise mediada pelo complemento. As duas séries de testes foram realizadas em ocasiões diferentes, com intervalo mínimo de 60 dias.

### 2 — Xenodiagnóstico

O teste foi realizado com quatro caixas, idealizadas por um de nós<sup>1</sup>, contendo cada caixa 10 ninfas de *Triatoma infestans*, aplicadas nos braços e antebraços do paciente. Este processo foi repetido três vezes, com intervalo médio de 10 dias entre as aplicações. Após 30 dias, foi efetuada a leitura por observação em microscópio de fase, do conteúdo intestinal obtido por compressão abdominal dos triatomíneos. Decorridos mais 30 dias, foi feita nova leitura, desta vez do material obtido através da dissecação dos triatomíneos.

### 3 — Hemocultura

Foram coletados de 20 a 30 ml de sangue venoso heparinizado de cada paciente. A técnica foi realizada conforme preconizado por CHIARI et al. (1979)<sup>7</sup>. Após a centrifugação inicial a 1500 g durante 30 minutos, o plasma foi retirado e as hemácias lavadas com meio LIT (Liver Infusion Tryptose) por nova centrifugação a 1500 g durante 15 minutos. Seguiu-se, então, a semeadura em meio LIT (seis tubos). As leituras foram realizadas por observação microscópica de gotas do meio, 15, 30 e 45 dias após a semeadura. Decorridos 60 dias, uma nova leitura foi realizada, quando, então, os tubos foram novamente centrifugados a 1500 g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e a leitura realizada na papa de hemácias.

### 4 — Lise mediada pelo complemento

Os soros recém obtidos foram congelados a -20°C. Para o teste foram descongelados, inativados e diluídos a 1:2 e 1:4. A técnica foi realizada conforme já descrito (LEVY et al., 1988)<sup>13</sup>. Foram utilizados os seguintes controles: 1 — “**complemento**” — para verificar se os camundongos foram adequadamente suprimidos e seus anticorpos não ficaram aderidos à membrana dos tripomastigotas, provocando resultados mais altos. Este mesmo controle permite verificar se o complemento humano utilizado na reação não provoca reações inespecíficas, tal como a aglutinação e/ou morte dos parasitas independente do fenômeno da lise; 2 — **negativo** — soros de pacientes cardiopatas não chagásicos. Foi estabelecido que neste controle não deveria ocorrer mais que 20% de lise dos tripomastigotas, embora a média tenha sido de cerca de 14% de lise; 3 — **positivo** — soros de pacientes chagásicos que em reações anteriores apresentaram lise acima de 41% dos tripomastigotas. Estes soros foram alíquotados após a reação e congelados a -20°C, devendo a cada reação repetir o resultado obtido na primeira vez, com variação de  $\pm 8\%$ ; 4 — **inespecífico** — os soros de pacientes não chagásicos foram adicionados a tripomastigotas, na diluição 1:3, para verificar se os parasitas não sofreram lise inespecífica após o período de incubação. Neste controle não foi adicionado complemento ativo e foi estabelecido que deveria dar um resultado tal que multiplicado por

três, fornecesse o número inicial de tripomastigotas, com variação de até 15%.

### RESULTADOS

Nos 36 pacientes submetidos ao xenodiagnóstico e à hemocultura obtivemos os seguintes resultados: 11 (30,5%) pacientes foram positivos no primeiro teste de xenodiagnóstico e 8 (22,2%) no segundo, sendo que 6 (16,6%) apresentaram resultados positivos tanto no primeiro quanto no segundo teste. Treze (36,1%) pacientes mostraram resultados positivos em pelo menos um dos testes. (Quadro 1).

Em relação à hemocultura, 3 (8,3%) pacientes mostraram resultados positivos na primeira amostra e 6 (16,6%) na segunda, sendo que 2

(5,5%) foram positivos em ambas amostras. Sete (19,4%) pacientes apresentaram parasitas em pelo menos uma das amostras. (Quadro 2).

Com a utilização de ambas provas parasitológicas, em duas amostras como explicado anteriormente, apenas 3 pacientes foram positivos em ambos os testes e 17 (47,2%) foram positivos em pelo menos uma das provas ou amostras. (Quadro 3).

Entre os 17 pacientes com provas parasitológicas positivas, 9 (53,0%) apresentaram níveis de anticorpos líticos considerados positivos, 5 (29,4%) mostraram níveis de anticorpos considerados negativos e 3 (17,6%) apresentaram resultados discordantes, ora positivos ora negativos, dependendo da amostra. (Figura 1).

QUADRO 1  
Resultados do xenodiagnóstico nos casos em estudo

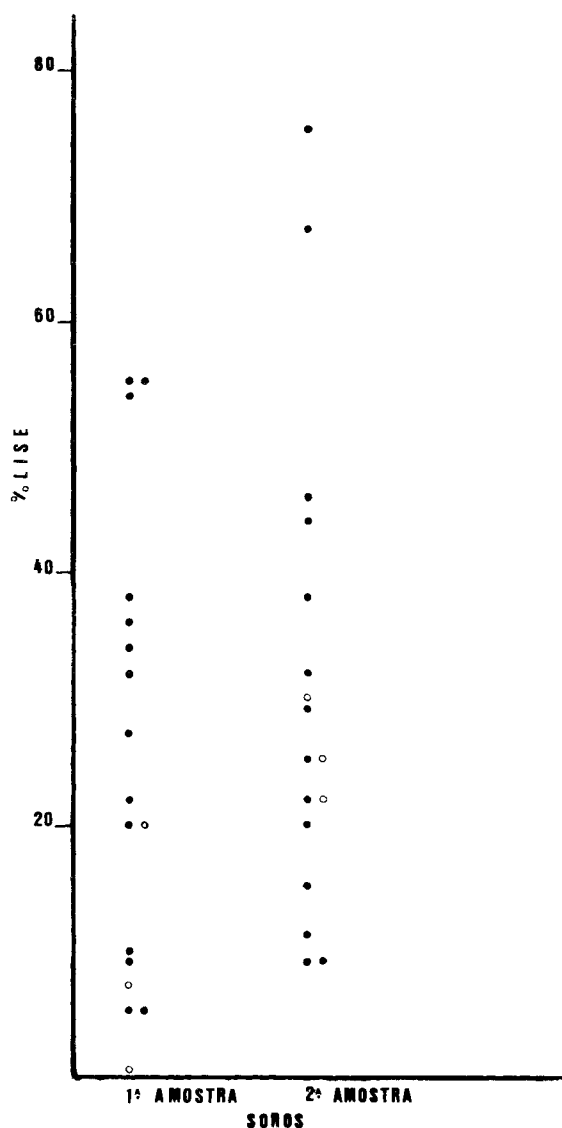
| Pacientes | Xenodiagnósticos |              |                   |               |               |
|-----------|------------------|--------------|-------------------|---------------|---------------|
|           | positivos        |              | ambas as amostras | Total         | negativos     |
|           | 1ª amostra       | 2ª amostra   |                   |               |               |
| 36        | 11<br>(30,5%)    | 8<br>(22,2%) | 6<br>(16,6%)      | 13<br>(36,1%) | 23<br>(63,9%) |

QUADRO 2  
Resultados da hemocultura nos casos em estudo

| Pacientes | Hemoculturas |              |                   |              | negativas     |
|-----------|--------------|--------------|-------------------|--------------|---------------|
|           | positivas    |              | ambas as amostras | Total        |               |
|           | 1ª amostra   | 2ª amostra   |                   |              |               |
| 36        | 3<br>(8,3%)  | 6<br>(16,6%) | 2<br>(5,5%)       | 7<br>(19,4%) | 29<br>(80,6%) |

QUADRO 3  
Resultados de ambos os testes parasitológicos nos casos em estudo

| Pacientes | casos positivos |              |                 | Total         | casos negativos |
|-----------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|
|           | xenodiagnóstico | hemocultura  | ambos os testes |               |                 |
| 36        | 13<br>(36,1%)   | 7<br>(19,4%) | 3<br>(8,3%)     | 17<br>(47,2%) | 19<br>(52,8%)   |



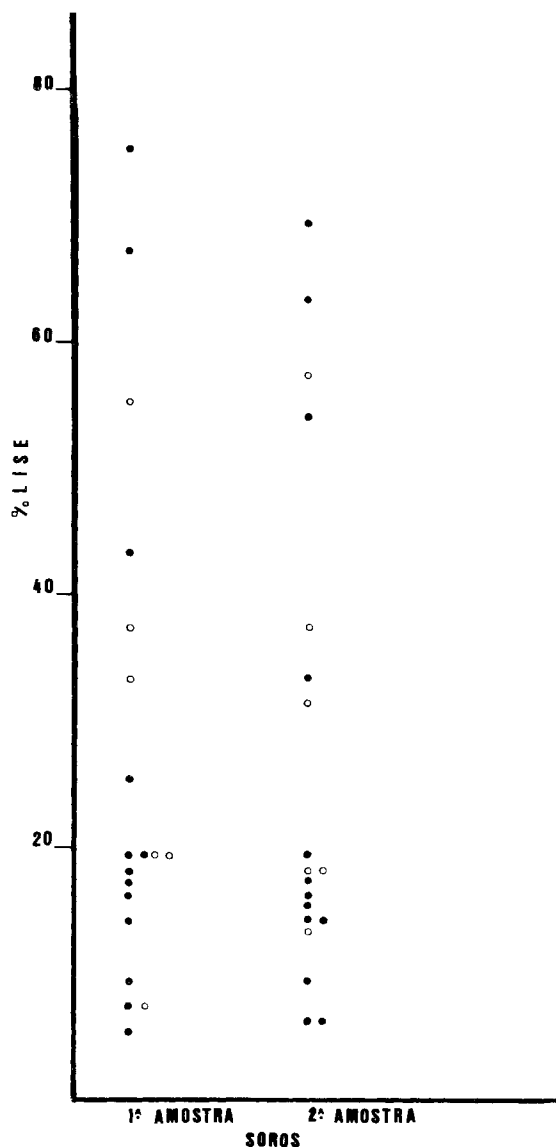
● = resultados concordantes em ambas amostras.  
○ = resultados discordantes.

Fig. 1 — Distribuição dos resultados de lise nas duas amostras de soro dos pacientes com provas parasitológicas positivas.

Entre os 19 pacientes com provas parasitológicas negativas, 9 (47,4%) apresentaram níveis de anticorpos líticos negativos, 4 (15,8%) apresentaram níveis positivos de lise e 6 (31,5%) mostraram resultados discordantes, ora positivos, ora negativos. (Figura 2).

### DISCUSSÃO

Desde a sua introdução por BRUMPT (1912)<sup>4</sup>



● = resultados concordantes em ambas amostras.  
○ = resultados discordantes.

Fig. 2 — Distribuição dos resultados de lise nas duas amostras de soros de pacientes com provas parasitológicas negativas.

numerosas pesquisas envolvem o xenodiagnóstico, visando aumentar seu índice de positividade. CERISOLA et al. (1974)<sup>6</sup> demonstraram que a utilização de 40 ninfas de 3º estágio de *T. infestans* oferecia 53% de testes positivos e que um maior número de insetos não aumentava proporcionalmente o índice de positividade. CASTRO et al. (1983)<sup>5</sup>, trabalhando com pacientes de zona endêmica, demonstraram que

a repetição do xenodiagnóstico, especialmente, nos indivíduos de baixa parasitemia, mostrava uma elevação significativa da positividade. BRONFEN et al. (1981)<sup>3</sup> e SZUMLEWICZ et al. (1987)<sup>16</sup> chamaram atenção para o uso de vetores de significância epidemiológica na região a ser realizado o xenodiagnóstico. A dissecação dos insetos utilizados no xenodiagnóstico, após a constatação negativa do parasita nas fezes do triatomíneo foi sugerida por BRONFEN.

Nossa experiência em laboratório (BOAINAIN, 1979)<sup>1</sup>, além de confirmar os dados obtidos por CERISOLA<sup>6</sup>, mostrou que determinadas espécies vetoras como *Triatoma vitticeps* e *Dipetalogaster maximus* não oferecem vantagens significativas sobre o *Triatoma infestans* na utilização para o xenodiagnóstico. A primeira mostrou-se menos suscetível ao *T. cruzi* e a segunda ofereceu um maior número de reações de hipersensibilidade nos pacientes (dados não publicados). Diante de tais dados, justifica-se a utilização de *T. infestans* no xenodiagnóstico. Esta espécie, além de possuir um alto grau de domiciliação, foi a que melhor se adaptou em nosso laboratório, possuindo alto grau de antropofilia e boa suscetibilidade ao *T. cruzi*.

A hemocultura, assim como o xenodiagnóstico, já foi extensivamente estudada, sempre com o objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica. Vários meios de cultura para o crescimento do *T. cruzi* foram desenvolvidos e estudados, visando um rápido aumento do número de protozoários eventualmente presentes (LOPETEGUI et al., 1982)<sup>14</sup>. Outros fatores importantes e inerentes à técnica foram também avaliados, como: o volume de sangue a ser utilizado (JANKVICIUS et al., 1979)<sup>9</sup>, a remoção do plasma e a lavagem das hemácias (CHIARI et al., 1979)<sup>7</sup>, a velocidade de centrifugação (SOUZA et al., 1985)<sup>15</sup> e os intervalos de leituras. Todos estes fatores são de extrema importância e podem interferir nos resultados obtidos (CHIARI, 1988)<sup>8</sup>.

Os pacientes chagásicos crônicos deste estudo constituíram-se em grupo homogêneo, no que diz respeito à idade, sexo, forma clínica e tempo de domiciliação em zona urbana. A positividade do xenodiagnóstico, nestes pacientes, na primeira bateria de testes foi de 30,6%, na segunda de 22,2% e em ambos testes de 36,1% confirmando

a variação da sensibilidade do xenodiagnóstico em testes reiteradamente praticados. Estes dados, diferem de outros anteriormente observados por nós (BOAINAIN, 1979<sup>1</sup> e BOAINAIN et al., 1979<sup>2</sup>) nos quais se obteve 43% de sensibilidade.

As mesmas observações foram notadas em relação à hemocultura que teve positividade de 19,4% nas duas amostras, inferior, portanto, à do xenodiagnóstico. Na primeira bateria foi encontrada positividade de 8,3% e na segunda de 16,7%.

A presença de *T. cruzi* na circulação sanguínea desperta a presença de anticorpos específicos que são capazes de provocar a lise de formas tripomastigotas na presença do complemento. Desta forma, tais anticorpos protetores só estariam presentes na infecção ativa. KRETTLI et al. (1982<sup>11</sup> e 1984<sup>12</sup>) mostraram que pacientes chagásicos crônicos não tratados apresentavam altos níveis de anticorpos líticos e que tais anticorpos poderiam ser evidenciados pela lise mediada pelo complemento ou pela imunofluorescência de membrana. No presente estudo, dos 17 pacientes com provas parasitológicas positivas, 9 (53,0%) também apresentaram resultados de lise positivos, ( $\bar{x}$  = 36% de lise dos tripomastigotas). Foi observado que 5 (29,4%) pacientes com provas parasitológicas positivas apresentaram resultados de lise negativos. A média de lise dos tripomastigotas nestes pacientes foi de 14%, semelhante à do grupo controle negativo. Quatro pacientes (21,0%) com provas parasitológicas negativas apresentaram níveis de anticorpos líticos considerados positivos. A manutenção de resultados positivos na lise poderia sugerir uma futura prova parasitológica positiva.

Deve ser observado que a lise mediada pelo complemento apresentou resultados discordantes, ora negativos, ora positivos, tanto em pacientes com provas parasitológicas negativas (31,5%) quanto em pacientes com provas parasitológicas positivas (17,6%). Nenhuma relação foi observada entre esses resultados da lise mediada pelo complemento e das provas parasitológicas, podendo um resultado de lise corresponder ou não a uma prova parasitológica positiva.

Sabe-se que a parasitemia em pacientes chagásicos crônicos é quase sempre muito baixa, residual e detectada com grande dificuldade através do xenodiagnóstico, da hemocultura e mesmo pela lise mediada pelo complemento. Mesmo pela associação destes métodos e/ou por exames seriados não se ultrapassa um índice de 50% de positividade (CHIARI, 1988)<sup>8</sup>. Considerando-se pelo menos uma das provas ou amostras positivas, a sensibilidade das provas parasitológicas foi de 47,2%. Ao final deste estudo, os pacientes positivos em qualquer prova parasitológica foram encaminhados ao tratamento tripanosomicida.

O presente estudo sugere que a lise mediada pelo complemento não se constitui em bom método para a triagem de pacientes candidatos ao tratamento, pela grande variabilidade dos resultados obtidos. A comprovação parasitológica da infecção crônica, através das provas parasitológicas, especialmente o xenodiagnóstico, embora insatisfatória para a seleção de pacientes ao tratamento, constitui-se, até o presente momento, no instrumento mais seguro para o clínico, especialmente quando reiteradamente praticado.

### SUMMARY

#### Xenodiagnosis, hemoculture and complement mediated lysis tests as criteria for selection of chronic chagasic patients for chemotherapy

Normally specific treatment of chronic Chagas' disease begins only after a positive parasitological diagnosis has been established. Xenodiagnosis, hemoculture and complement mediated lysis were associated, and repeated, as an attempt to increase the number of selected candidates for specific treatment. Thirty six chronic chagasic patients were submitted to two series of the above tests, with a minimal interval of 60 days. In the first series of tests sensitivity of xenodiagnosis and hemoculture were 30.5% and 8.3% respectively. Processing of a second sample increased sensitivity to 36.1% (xenodiagnosis) and 19.4% (hemoculture); 47.2% were shown to be positive by at least one of these tests. From the positive cases, 29.4% were consistently negative in the complement mediated lysis test, and 17.6% exhibited discordant results, positive on

one occasion and negative on the other. Among patients with negative parasitological tests, 47.4% had negative complement mediated lysis tests, 31.5% exhibited discordant results and 15.8% were positive.

We conclude that complement mediated lysis test is not a method of choice in the selection of candidates for specific treatment of Chagas' disease in view of the observed variability of results. At this moment, parasitological tests, in spite of a low sensitivity, are a safer tool for the clinician.

### AGRADECIMENTOS

À Bióloga Ediliz Maria Ramos de Amorim pela participação ativa no presente estudo.

À Técnica de Laboratório Vera Lucia Fioratti pela realização das provas sorológicas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOAINAIN, E. — Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. goiana Med.*, 25: 1-60, 1979.
2. BOAINAIN, E.; PEREIRA, V. L.; SAVASTANO, L. B. M. & RAMOS, M. C. — Avaliação da sensibilidade do xenodiagnóstico. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979. *Anais*, p. 153.
3. BRONFEN, E.; DIAS, J. C. P. & ROCHA, F. S. A. — Early examination of xenodiagnosis as an alternative to improve efficiency of this method on chronic Chagas disease. In: REUNIÃO ANUAL SOBRE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, Caxambú, 1981. *Programa e resumos*, p. 58, res. n.º 60.
4. BRUMPT, E. & SILVA, P. — Existence du *Schyzotrypanum cruzi* Chagas 1909, à Bahia (Matta de São João) - Biologie du *Conorhinus megistus*. *Bull. Soc. Path. exot.*, 5: 22-26, 1912.
5. CASTRO, C. N.; ALVES, M. T. & MACEDO, V. O. — Importância de repetição de xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 16: 98-103, 1983.
6. CERISOLA, J. A.; ROHEDDER, R. W.; SEGURA, E.; DEL PRADO, C. E.; ALVAREZ, M. & DE MARTINI, G. W. — *El xenodiagnóstico*. Buenos Aires, Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", 1974. 112 p. (Mimeografado).

7. CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M. & CHIARI, C. A. — Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979. *Anais*, p. N1 N5.
8. CHIARI, E. — Aspectos práticos do diagnóstico parasitológico em doença de Chagas. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 5., Araxá, MG, 1988. *Programa e resumos*, p. 10.
9. JANKEVICIUS, S. I.; MAEJIMA, H. K.; JANKEVICIUS, J. V.; SANTOS, L.; MARTINEZ, M. M. R. & MAEDA, L. A. — *Trypanosoma cruzi* hemoculture in blood banks. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979. *Anais*, p. 150.
10. KRETTLI, A. U.; WEISZ CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R. S. — Membrane bound antibodies to bloodstrain, *Trypanosoma cruzi* in mice — Strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clin. exp. Immunol.*, 37: 416-423, 1979.
11. KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. — Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 76: 333-340, 1982.
12. KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. — Criterion of cure of human Chagas disease after specific chemotherapy: recent advances. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 157-164, 1984.
13. LEVY, A. M. A.; PEREIRA, V. L. & BOAINAIN, E. — Avaliação da técnica de lise mediada por complemento em pacientes chagásicos crônicos tratados com drogas tripanosomicidas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 30: 32-39, 1988.
14. LOPETEGUI, R. & SOSA MIATELLO, C. — Desarrollo y diferenciación de *Trypanosoma cruzi* in medios líquidos libres de células. *Rev. lat-amer. Microbiol.*, 24: 125-133, 1982.
15. SOUZA, H. A. & LUQUETTI, A. O. — Hemocultura na fase crônica da doença de Chagas. Padronização da força centrífuga do sangue heparinizado. In: REUNIÃO ANUAL SOBRE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 4., Araxá, MG, 1987. *Programa e resumos*, p. 48. (*Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 20 (supl. 2): 48, 1987).
16. SZUMLEWICZ, A. P. & MULLER, C. A. — Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas' disease. 2 — Attempts to upgrade the reliability and the efficacy of xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 259-272, 1987.

Recebido para publicação em 13/3/1989.