

DISCREPÂNCIAS ENTRE RESULTADOS DE REAÇÕES DE GUERREIRO-MACHADO EXECUTADAS EM DIFERENTES LABORATÓRIOS

A. Prata*, W. Mayrink**, A. G. Sodré*** e J. O. Almeida****

Reações de fixação de complemento feitas em três laboratórios, usando basicamente a mesma técnica, apresentaram resultados discrepantes com soros chagásicos. Somente 16 soros de um lote de 26 pacientes em fase aguda de infecção tiveram resultados positivos nos três laboratórios, embora nenhum deles fosse unanimemente negativo. Quando 224 soros de casos parasitologicamente comprovados de doença de Chagas foram examinados, resultados positivos foram obtidos em 95% deles em um laboratório, 89% em outro e apenas 64% no terceiro. Os resultados mostraram que as discrepâncias observadas dependiam da qualidade dos antígenos usados, dando ênfase à necessidade não só da padronização dos preparados antigênicos, como também da metodologia do teste, a fim de se poder ter resultados comparáveis quanto à sensibilidade e especificidade da reação de Guerreiro-Machado.

INTRODUÇÃO

O estudo da discrepância relativa entre os resultados obtidos por reação de fixação de complemento com antígeno de *Trypanosoma cruzi* foi feito por Almeida & Siqueira⁶ com soros chagásicos examinados em duplicado. Observaram esses autores que em pares de reações paralelas e simultâneas, utilizando-se os mesmos reativos, as discrepâncias observadas e produzidas por erros técnicos, não eram de maior grandeza e freqüência, que as determinadas em outros sistemas, como sífilis⁵ e lepra⁴. Desses estudos se pode concluir que os mesmos critérios adotados naqueles sistemas, para a avaliação de antígenos, podiam ser empregados na reação de Guerreiro-Machado, por técnica quantitativa com o antígeno de *T. cruzi* preparado segundo Freitas & Almeida⁸.

No entanto, antígenos preparados por outros métodos, aliados a técnicas diversas de fixação de complemento, poderiam dar resultados discrepantes, quando os mesmos soros eram examinados nessas diferentes condições.

Neste trabalho são apresentados os resultados obtidos nos mesmos soros examinados nos laboratórios da Fundação Gonçalo Muniz, em Salvador, Bahia, no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e no Instituto Nacional de Endemias Rurais, em Belo Horizonte.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros humanos

O soros foram de pacientes residentes em São Felipe, no Reconcavo Baiano. Vinte e seis

* Prof. Catedrático da Universidade de Brasília, D.F.

** Laboratório de Sorologia do Centro de Pesquisas René Rachou. INERU., M.G.

*** Fundação Gonçalo Muniz, Salvador, Bahia.

**** Depto de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Fac. de Med. de Rib. Preto, USP. Prof. catedrático. Recebido para publicação em 29-12-75.

pacientes estavam em fase aguda da moléstia de Chagas e 224, em fase crônica, tinham tripanossomas demonstráveis por xeno-diagnose. Além desses soros, foram examinados pelos três laboratórios mencionados, trezentos e trinta e nove soros.

Antígenos

Dois tipos de antígenos foram empregados: o antígeno gelificado cloroformado, preparado segundo Freitas & Almeida⁸ e o extrato metílico, de acordo com a técnica de Batista & Santos⁷.

Técnica da reação de fixação de complemento

Foi basicamente a mesma, a técnica de fixação de complemento, empregada pelos três laboratórios. O soro humano foi usado no volume de 0,05 ml, antígeno em dose de máxima reatividade³ no volume de 0,1 ml, sendo o complemento empregado na dose de 3,0 a 3,6 unidades hemolíticas 50%. O tempo de incubação para a fixação foi de 90 minutos e para hemólise de 15 a 30 minutos a 37°C. Em dois laboratórios reações com títulos menores que 1,7 eram consideradas não reagentes enquanto em outro, definia-se um resultado negativo pela hemólise total no tubo reação. Em dois laboratórios empregou-se somente o antígeno cloroformado de Freitas & Almeida⁸, enquanto em outro empregou-se também o antígeno metílico de Batista & Santos⁷.

Nos três laboratórios a técnica básica da reação foi a descrita por Freitas & Almeida⁸.

RESULTADOS

1. Dos soros de 26 pacientes em fase aguda da moléstia de Chagas apenas 16 tiveram reações positivas de fixação de complemento nos três laboratórios. Isoladamente um dos laboratórios apresentou 20 resultados positivos, outro 23 e o último 24. Nenhum dos soros apresentou resultado negativo nos três laboratórios.
2. Soros de pacientes com xeno-diagnóstico positivo foram examinados pelos três laboratórios, numa amostragem desigual. Um dos laboratórios examinando 224 soros obteve resultados positivos em apenas 144 (64%); outro em 44 soros teve 39 (89%) reações positivas e um terceiro laboratório em 123 soros apresentou 117 (95%) reações positivas.
3. Soros com xenodiagnóstico positivo e negativo, num total de 339 foram examinados pelos três laboratórios. Um deles reportou 127 reações positivas, um outro 158 e o terceiro 131.

Quando se compararam os resultados obtidos pelo primeiro e segundo laboratório verificou-se que 28,6% dos soros tinham reações em conflito. Entre o primeiro e o terceiro laboratório, 22,4% dos soros tinham reações discordantes, enquanto entre o segundo e terceiro laboratório, 15% dos soros tinham reações discrepantes.

DISCUSSÃO

As discrepâncias observadas entre os resultados da reação de Guerreiro-Machado praticadas em três laboratórios diferentes, não podem ser incriminadas somente às pequenas diferenças de técnica da reação, todos eles seguindo o método preconizado por Freitas & Almeida⁸.

Consideramos a diversa reatividade entre os antígenos empregados, o antígeno aquoso cloroformado de Freitas & Almeida⁸ e o antígeno metílico de Batista & Santos⁷, em relação aos soros não chagásicos, como uma das causas das discrepâncias observadas. Há no entanto necessidade de se ter em mente outros parâmetros que podem influenciar na sensibilidade e especificidade da reação de Guerreiro-Machado. Um deles é o modo como esses soros foram mantidos durante o tempo em que a investigação foi feita, o transporte a longas distâncias, o congelamento e o degelo de soros¹, a re-ativação repetida de soros já previamente inativados² e a eventual contaminação bacteriana das amostras de soro submetidas a exame.

Quando os mesmos soros foram submetidos à exame no mesmo laboratório, com os mesmos elementos, diferenciando apenas o antígeno, os resultados foram comparáveis quanto à sensibilidade (96%), de acordo com Salgado e colab.⁷ que examinaram 66 chagásicos crônicos, por xenodiagnóstico e fixação de complemento, empregando os antígenos benzeno-cloroformado e o metílico em 224 e 220 amostras de sangue, respectivamente.

Se considerarmos que num mesmo laboratório, a manutenção do soro chagásico em geladeira pode afetar sua reatividade², não se é de estranhar que resultados discrepantes sejam produzidos por alterações das imunoglobulinas, ocorridas até que o soro seja examinado. Investigação dessa natureza exige que se estabeleçam técnicas rígidas e apropriadas de colheita de sangue, separação e processamento do soro para ser enviado a laboratórios situados a grandes distâncias, e somente nessas condições poder-se-á avaliar a especificidade e sensibilidade dos métodos empregados na soro-diagnose da moléstia de Chagas.

SUMMARY

Complement-fixation tests performed in three laboratories, using basically the same technique, presented discrepant results with Chagasic sera. Only 16 sera from a lot of 26 in the acute phase of the infection had positive tests in the three laboratories, although none of them presented a consensus of negative tests. When 224 sera from parasitologically proven cases of Chagas disease were tested, positive results were obtained in 95% of them in one laboratory, 89% in the second one and only 64% in the other. The results showed that the discrepancies observed depended of the quality of the antigens used, stressing the necessity of the standardization not only of the antigen preparations but also of the methodology of the tests, in order to have comparable results in the Guerreiro-Machado tests, in sensitivity and specificity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.O. & PADRON, C. — Wassermann quantitativo. Alteração do título em soro congelado e degelado várias vezes. *Folia Clinica et Biológica*, 18:3-6, 1952.
2. ALMEIDA, J.O.; SARAIVA, L.G. & NUSSENZWEIG, V. — Estudos sobre as reações quantitativas de fixação de complemento. I. Alteração de títulos em reações de fixação de complemento pela inativação e manutenção dos soros em geladeira, nos sistemas sífilis, doença de Chagas, tuberculose e lepra. *Rev. Paul. Med.*, 43:446, 1953.
3. ALMEIDA, J.O. — Isofixation curves as a method for standardization of quantitative complement fixation test. *J. Immunol.*, 76:259-263, 1956.
4. ALMEIDA, J.O., — Preparo, padronização e comparação de antígenos em reações quantitativas de fixação de complemento com soro de doentes de lepra. *Rev. Brasil. Leprol.*, 26:181-271, 1958.
5. ALMEIDA, J.O. & THOMPSON, W.R. — Sequential tests of antigen components. Influence of technical variability and of producer aim. Annual Report of the Div. Lab. Res., New York State Dep. Health, pg. 35-36, 1955.
6. ALMEIDA, J.O. & SIQUEIRA, A.F. — Estudo da discrepância relativa entre pares de reações simultâneas de fixação de complemento no sistema moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 2:204-212, 1960.
7. BATISTA, M.S. & SANTOS, U.M. — Antígeno metílico de cultura de *Schizotrypanum cruzi*. *O Hospital*, 56:1045-1051, 1959.
8. FREITAS, J.L.P. & ALMEIDA, J.O. — Nova técnica de fixação de complemento pra moléstia de Chagas. (Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*). *O Hospital*, 35:787-800, 1949.
9. SALGADO, A.A.; MAYRINK, W. & DIAS, J.C.P. — Estudo comparativo entre a reação de fixação de complemento, com os antígenos benzeno-cloroformado e metílico e o xenodiagnóstico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12:36-40, 1970.