

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO EM PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS TRATADOS COM DROGAS TRIPANOSOMICIDAS

Antonio Marcos de Aparecida LEVY (1), Vera Lucia PEREIRA (1) & Elias BOAINAIN (2)

RESUMO

Os níveis de anticorpos líticos foram determinados em pacientes chagásicos crônicos, tratados com nifurtimox ou benzonidazol, através da Lise Mediada por Complemento (LMCo). Dois grupos de pacientes foram estudados: um grupo tratado há mais de seis anos e outro há menos de seis anos. Ambos os grupos, após o tratamento, apresentaram xenodiagnósticos negativos, embora as provas sorológicas permanecessem reagentes. Foram incluídos um grupo controle negativo com provas sorológicas não reagentes e um grupo controle positivo com provas sorológicas e parasitológicas positivas. Para a LMCo foram utilizadas duas amostras de cada paciente, obtidas em ocasiões diferentes, tanto dos grupos estudados quanto do grupo controle positivo. Em vista dos resultados foi calculada a sensibilidade da reação (83,3%) e a especificidade (100,0%). Nos grupos estudados observou-se que cerca da metade dos pacientes apresentaram lise menor do que 20%, podendo, este resultado, corroborar a "cura parasitológica". Notou-se que 43,6% dos pacientes tratados há mais de seis anos apresentaram resultados contraditórios, ora negativos, ora positivos, dependendo da amostra. Tais resultados foram considerados inconclusivos, em virtude das provas parasitológicas permanecerem negativas. Um seguimento a longo prazo poderá esclarecer o significado desses resultados.

UNITERMOS: Técnica de lise mediada por complemento; Doença de Chagas-tratamento.

INTRODUÇÃO

Entre as dificuldades encontradas pelo clínico na avaliação da terapêutica durante a fase crônica da doença de Chagas ressalta a demonstração da presença do *Trypanosoma cruzi* antes do tratamento e uma prova decisiva que evidencie o seu desaparecimento após a medicação. Entre os métodos preconizados para o diagnóstico parasitológico do *T. cruzi* destacam-se o xenodiagnóstico e a hemocultura. O primeiro, embora trabalhoso, tem-se mostrado a técnica de eleição, com sensibilidade em torno de 40%². A

hemocultura apresenta resultados variados conforme o pesquisador^{5, 8}, porém com sensibilidade não superior à do xenodiagnóstico.

O aparecimento de trabalhos sobre anticorpos líticos revelou a possibilidade de uma nova técnica para a avaliação da eficácia terapêutica, pois tais anticorpos só apareceriam na infecção ativa pelo *T. cruzi*, estando ausentes com o desaparecimento da infecção^{3, 9, 11}.

Os níveis de anticorpos líticos através da lise mediada por complemento foram pesquisados em pacientes chagásicos crônicos, no Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia.

O objetivo do presente estudo foi avaliar esta técnica como critério de "cura parasitológica" em pacientes chagásicos submetidos à quimioterapia.

MATERIAL E MÉTODOS

1 — Soros

1-1 — Grupo I

Soros de 20 pacientes cardiopatas não chagásicos, com provas sorológicas convencionais para doença de Chagas, não reagentes.

1-2 — Grupo II

Soros de 18 pacientes chagásicos crônicos, com xenodiagnósticos e/ou hemoculturas positivos, ainda não submetidos à quimioterapia.

1-3 — Grupo III

Soros de 79 pacientes chagásicos crônicos tratados há mais de seis anos com nifurtimox ou benzonidazol e com xenodiagnósticos negativos após a terapêutica, mensalmente praticados.

1-4 — Grupo IV

Soros de 20 pacientes chagásicos crônicos tratados entre três e seis anos com benzonidazol, também com xenodiagnósticos negativos após a terapêutica e mensalmente praticados.

Os pacientes dos Grupos III e IV apresentaram provas sorológicas convencionais, para doença de Chagas, positivas antes e após a terapêutica. A técnica de lise mediada por complemento foi repetida pelo menos em duas ocasiões, em todos os pacientes, exceto nos pacientes do Grupo I.

2 — Parasitas

Camundongos isogênicos da linhagem A/Sn, com peso médio de 15g, foram imunossuprimi-

dos com 200 a 350 mg/kg de ciclofosfamida, 48 a 72 horas após o inóculo¹⁴ de *T. cruzi*, cepa Y¹⁵. O sangue, coletado no pico da parasitemia, foi submetido à centrifugação diferenciada para a separação dos tripomastigotas sanguíneos. Para o uso foram ajustados à concentração de 4×10^6 a 6×10^6 parasitas/ml, para facilitar a contagem dos parasitas, visto que concentrações maiores tornam a leitura trabalhosa e sujeita a erros.

3 — Técnica de lise mediada por complemento

Foi utilizada a técnica descrita por KRETTLI¹⁰ com algumas modificações: 1 — de acordo com UMEZAWA¹⁷ 100 μ l de soro diluídos 1:2 e 1:4 foram adicionados a 50 μ l de parasitas; 2 — uso de placas de microtitulação em substituição aos tubos de ensaio; 3 — a manutenção dos parasitas foi feita em meio Eagle com 5% ou 10% de soro de vitela.

Os soros do presente estudo foram congelados a -20°C desde a sua extração e inativação por aquecimento a 56°C por 30 minutos, pouco antes do uso. Caso necessário, os soros foram repetidos apenas uma vez, evitando-se a manipulação excessiva que favorecia a aglutinação de parasitas no controle com o "complemento inativo".

Foram considerados negativos os soros que apresentaram níveis de até 20% de lise dos tripomastigotas e como positivos os acima desse valor¹². Os resultados foram expressos em porcentagem de lise.

4 — Provas laboratoriais complementares

4-1 — Provas sorológicas convencionais

Todos os soros utilizados para o estudo foram submetidos às seguintes provas: 1 — fixação de complemento¹; 2 — imunofluorescência indireta⁴; 3 — hemaglutinação indireta com 2-mercaptoetanol⁶; 4 — aglutinação direta com 2-mercaptoetanol¹⁶.

4-2 — Provas parasitológicas

O xenodiagnóstico foi realizado com 40 ninhas de *Triatoma infestans* com leituras após 30 e 60 dias, segundo a metodologia utilizada por

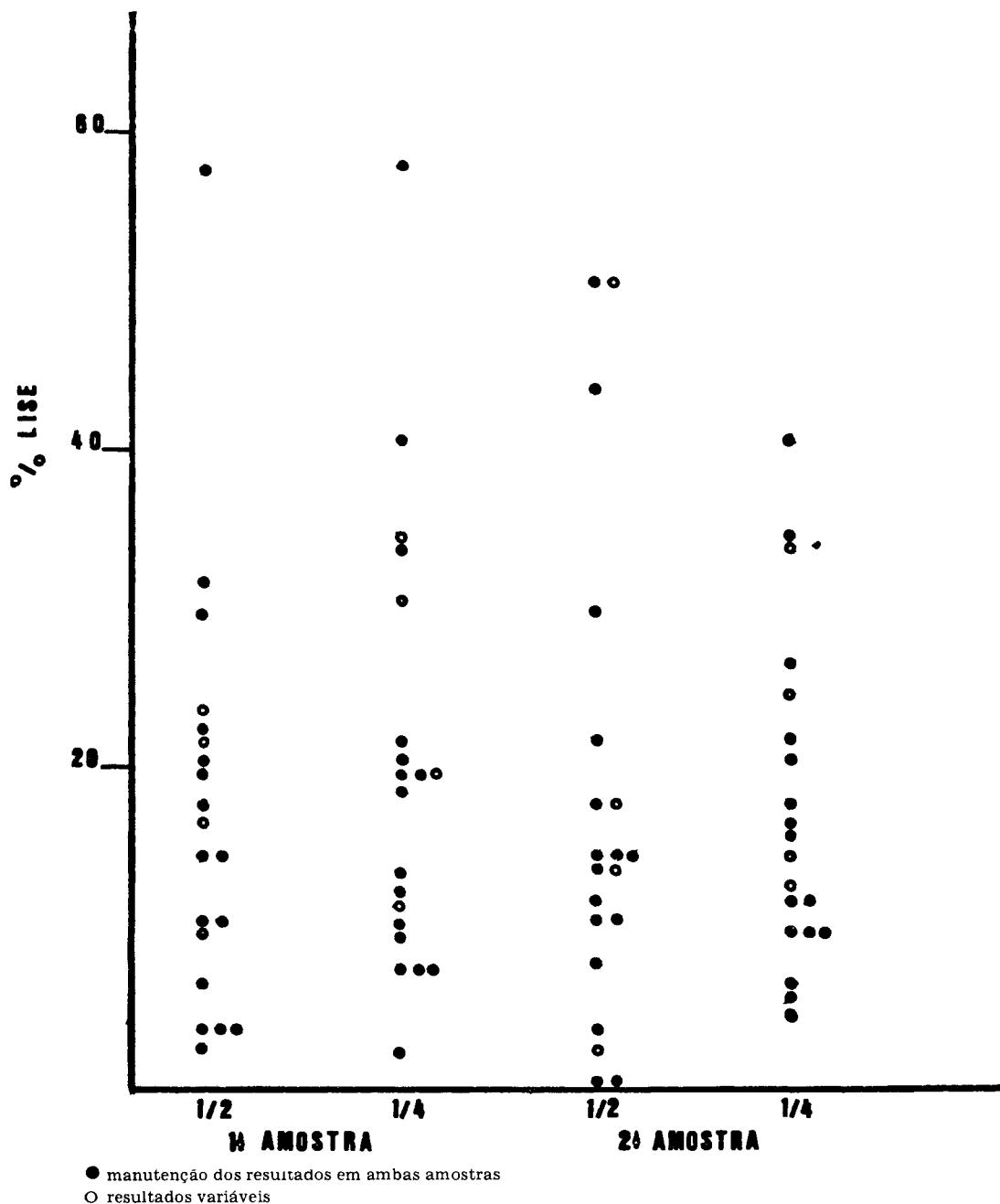


Fig. 3 — Grupo III: distribuição dos resultados de lise nas duas amostras (diluições 1:2 e 1:4) de soro.

Nos soros do Grupo IV, pacientes tratados há menos de seis anos (Fig. 4), observou-se a mesma dispersão das amostras do Grupo III. Doze soros (60.0%) mantiveram os resultados abaixo de 20% em ambas amostras, ao passo que quatro

soros (20.0%) mostraram valores acima de 20% (sendo que um deles com valores bastante elevados) e os quatro restantes (20.0%) oscilaram nas duas amostras e/ou diluições.

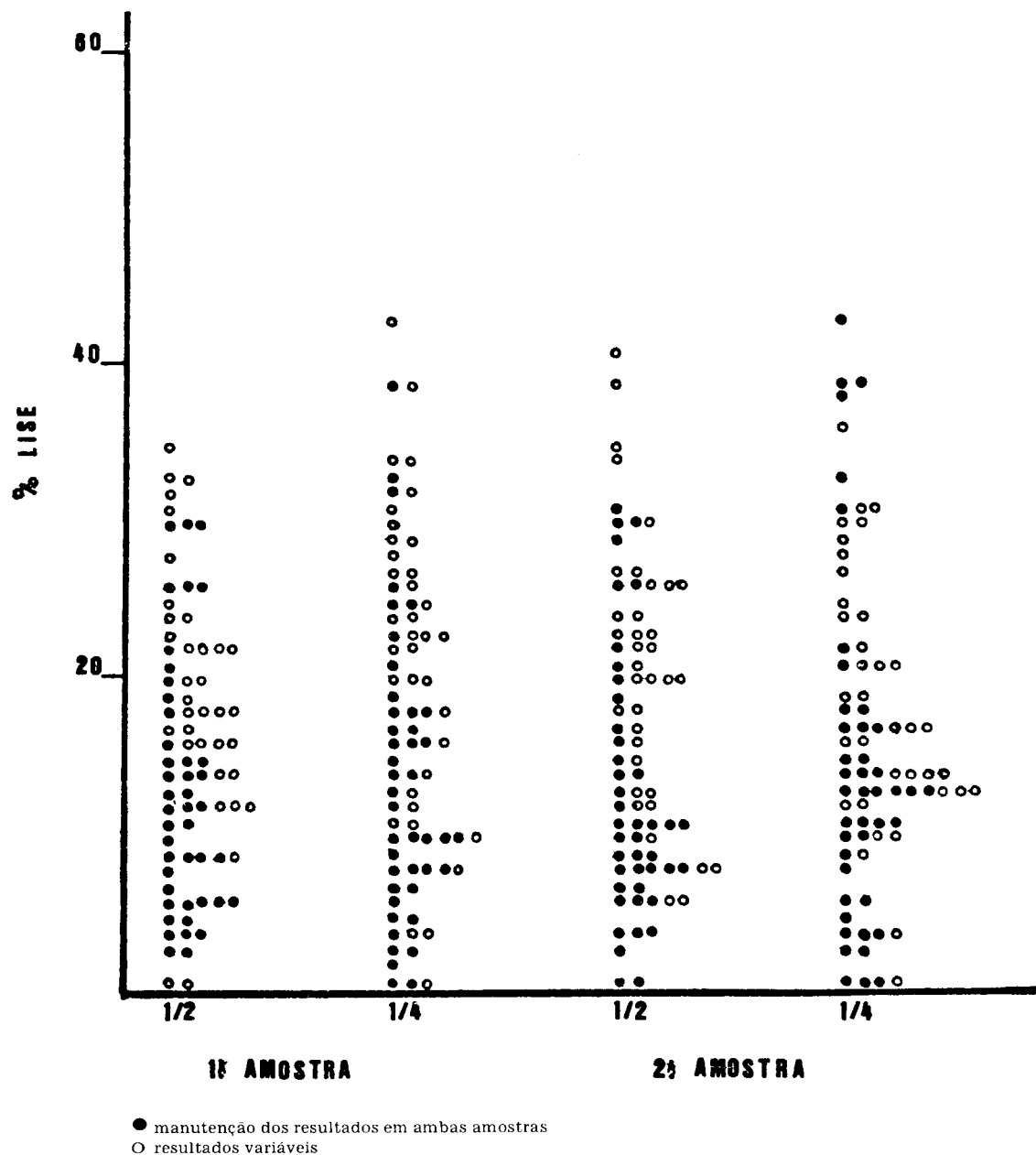


Fig. 4 — Grupo IV: distribuição dos resultados de lise nas duas amostras (diluições 1:2 e 1:4) de soro.

DISCUSSÃO

A técnica de lise mediada por complemento é um método indireto e, como tal, sujeita a uma

série de fatores que podem influenciar o resultado. Esses fatores podem estar relacionados a animal experimental, ao parasita, à manipulação ou ao estado imunológico do paciente. Vi-

sando, por exemplo, verificar qual o erro relativo à contagem, submeteu-se um mesmo hemocitômetro a três técnicos que efetuavam as leituras, observou-se uma variação de 6%. Todas essas dificuldades, pois, devem ser levadas em conta na avaliação dos resultados.

A tabela I expressa os resultados de lise menor que 20% em todos os grupos. Aplicando-se o teste do "t" Student verifica-se que não há

diferença, estatisticamente significativa no nível de 1%, entre as diluições 1:2 e 1:4. O mesmo pode ser observado na tabela II, na qual se mostra os resultados dos pacientes que apresentaram lise maior que 20%. O uso de duas diluições, entretanto, pode ser útil para um controle de qualidade. Sempre que os resultados não mostravam variação dentro dos desvios padrões observados, optamos por repetição da leitura ou mesmo da reação.

TABELA I
Distribuição dos soros com porcentagem de lise menor que 20%

	Grupo I		Grupo II				Grupo III				Grupo IV			
	1A		1A		2A		1A		2A		1A		2A	
	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4
n	20	20	3	3	3	3	36	36	36	36	12	12	12	12
$\bar{x} \pm Dp(\%)$	10 ± 7	9 ± 7	6 ± 4	5 ± 3	9 ± 6	8 ± 6	11 ± 5	10 ± 6	9 ± 5	9 ± 5	10 ± 7	12 ± 7	9 ± 6	11 ± 5
min/máx(%)	0-20	0-19	2-10	3-8	2-15	1-20	2-20	2-20	0-20	0-20	2-20	2-20	0-17	4-20
Si	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(1A e 2A): 1ª e 2ª amostras de soro, respectivamente; (1:2 e 1:4): diluições dos soros; (n): número de pacientes; ($\bar{x} \pm Dp$): média e desvio padrão das porcentagens de lise; (min/máx): valores mínimo e máximo das porcentagens de lise encontradas nos respectivos grupos; (Si): significância entre as diluições 1:2 e 1:4; (ns): não significante.

TABELA II
Distribuição dos soros com porcentagem de lise maior que 20%

	Grupo II				Grupo III				Grupo IV			
	1A		2A		1A		2A		1A		2A	
	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4	1:2	1:4
n	12	12	12	12	7	7	7	7	4	4	4	4
$\bar{x} \pm Dp(\%)$	38 ± 19	43 ± 17	32 ± 17	29 ± 14	26 ± 3	28 ± 5	27 ± 4	33 ± 6	37 ± 20	35 ± 11	38 ± 17	33 ± 13
min/máx(%)	21-55	21-63	22-75	22-55	21-29	22-38	21-30	21-42	22-57	21-57	21-50	21-40
Si	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(1A e 2A): 1ª e 2ª amostras de soro, respectivamente; (1:2 e 1:4): diluições dos soros; (n): número de pacientes; ($\bar{x} \pm Dp$): média e desvio padrão das porcentagens de lise; (min/máx): valores mínimo e máximo das porcentagens de lise encontradas nos respectivos grupos; (Si): significância entre as diluições 1:2 e 1:4; (ns): não significante.

Os resultados encontrados no Grupo I foram compatíveis com os encontrados por outros autores^{11, 12}, atestando, assim a especificidade do método (100.0%) de acordo com os conceitos de GALEN e GAMBINO⁷. Usando o cálculo preconizado por estes autores, a sensibilidade foi de 83,3%, considerando as duas amostras, adotando-se como valor discriminante 20% de lise dos tripomastigotas. A eficiência¹³ de reação, isto é,

a sua capacidade de diagnosticar tanto positivos quanto negativos, em duas amostras foi de 0,921.

Nos pacientes do Grupo II, houve concordância nos resultados de 83,4% nas duas amostras. Nos pacientes do Grupo III essa concordância foi de 54,4% ao passo que no Grupo IV foi de 80.0%.

Assumindo-se como valor discriminante o índice de 20% de lise, os resultados mostram que, teoricamente, o tratamento teria sido eficaz em cerca de 50% dos casos, independente do tempo decorrido após a administração da droga (menos ou mais de seis anos). Ressalte-se que não se cogita da avaliação na evolução dos resultados de lise, desde que não se dispõe do valor da mesma antes do tratamento.

Taxas de lise entre 21 e 42% foram apresentadas por sete soros do Grupo III e quatro soros do Grupo IV. Estes pacientes apresentaram provas parasitológicas negativas tanto quanto aqueles que apresentaram lise menor que 20%. É difícil supor que tais pacientes não estejam ainda "curados", pois os pacientes do Grupo III foram tratados há mais de seis anos. Quanto ao paciente do Grupo IV que apresentou valores bastante elevados (Fig. 4), pensamos que tais valores poderiam corresponder ou a um resultado falso positivo, ou indicar persistência da infecção com possibilidade de um futuro xenodiagnóstico positivo.

Nas figuras 3 e 4 verifica-se que 36 soros (45.6%) do Grupo III e 4 soros (20.0%) do Grupo IV apresentaram resultados que variaram de 0 a 50% podemos ser classificados, ora como positivos, ora como negativos, dependendo da amostra. Diante das provas parasitológicas persistentemente negativas, preferimos classificá-los como inconclusivos. O seguimento laboratorial desses pacientes (o que está sendo realizado) poderá esclarecer o significado dos valores encontrados na lise mediada por complemento, em função das provas parasitológicas.

SUMMARY

Evaluation of complement mediated lysis in chronic chagasic patients treated with trypanosomicidal drugs.

Levels of lytic antibodies were determined by complement mediated lysis (CoML) in chronic chagasic patients treated with nifurtimox or benznidazole. Two groups of patients were studied: one who had been treated more than six years ago and another with less than six years since treatment, although serologic reactions re-

mained positive. CoML was carried out in two samples obtained from patients on different occasions, in test groups as well as in positive controls. In view of results observed sensitivity of reaction (83.3%) and its specificity (100.0%) were calculated. It was observed that about half of the patients presented lysis up to 20% and this result may corroborate "parasitological cure". It was noted that 43.6% of patients treated more than six years ago and 20.0% of patients with less than six years since treatment presented variable results, either positive or negative, differing for each sample from the same individual. Such results were thus considered as inconclusive, since parasitological tests remain negative. A prolonged follow-up may shed light over such results.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Judith K. Kloetzel — Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — Universidade de São Paulo — pela revisão do texto em inglês.

Ao Dr. Ricardo Manrique — Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia — pela leitura crítica do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARACCHINI, O. & SILVA, M. B. — Emprego da técnica de Kolmer, modificada na fixação de complemento, usando antígeno metílico de *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico da doença de Chagas. *Rev. Inst. A. Lutz (S. Paulo)*, 29-30: 73-79, 1969/70.
2. BOAINAIN, E. — Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. goiana Med.*, 25: 1-60, 1979.
3. BRENER, Z.; RAMIREZ, L. E.; KRETTLI, A. U. & CANÇADO, J. R. — EVI antibodies in patients with Chagas disease: relationship with anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulins and effects on specific treatment. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 78: 437-442, 1983.
4. 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: 227-234, 1966.
5. CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M. & CHIARI, C. A. — Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in chronic phase. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS. *Anais*. Rio de Janeiro, 1979. p. N1-N5.

6. FUCHS, A. P.; FIORATTI, V. L.; MELLO, V. A. & BOAINAIN, E. — Diagnóstico sorológico na doença de Chagas. Estudo comparativo de diferentes técnicas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 22: 242-245, 1980.
7. GALEN, R. S. & GAMBINO, S. R. *apud*. GUIMARÃES, M. C. S. — Exames de laboratório, sensibilidade, especificidade, valor preditivo. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 18: 117-120, 1985.
8. GALVÃO, L. M. C.; CANÇADO, J. R.; BRENER, Z. & KRETTLI, A. U. — Controle de cura através da lise mediada por complemento (LMCo) e hemocultura em pacientes chagásicos submetidos a tratamento específico. In: REUNIÃO ANUAL SOBRE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 12., Caxambú, 1985. *Programa e resumos*, p. 139.
9. KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. — Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, 116: 755-760, 1976.
10. KRETTLI, A. U. — Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotas sanguíneos de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* Belo Horizonte, 1978. (Tese de doutoramento — Universidade Federal de Minas Gerais).
11. KRETTLI, A. U. — Protective antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections: detection, functional activity and possible mechanisms of trypomastigote killing "in vivo" and "in vitro". *Mem Inst. Osw. Cruz*, 79 (supl.): 59-65, 1984.
12. KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. — Criterion of cure of human Chagas' disease after specific chemotherapy: recent advances. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 79 (supl.): 157-164, 1984.
13. PRIMAVERA, K. S. C. — Eficiência dos antígenos das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* para a detecção de anticorpos das classes A, M, E, G, nas diferentes formas clínicas da infecção chagásica, pela reação de imunofluorescência indireta. São Paulo, 1985. (Tese de doutoramento — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
14. ROMEIRO, S. A.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. — Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. *Clin. exp. Immunol.*, 55: 413-418, 1984.
15. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia clin. biol. (S. Paulo)*, 20: 191-208, 1953.
16. STONI, P. D.; BOLSI, F. L. & YANOVSKY, J. F. — Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2-mercaptoetanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. *Medicina (B. Aires)*, 31: 67-72, 1975.
17. UMEZAWA, E. S. — Comunicação pessoal. (1985).

Recebido para publicação em 24/4/1987.