

AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA A REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA. II. ANTÍGENOS DE DIFERENTES AMOSTRAS E FORMAS EVOLUTIVAS

Ricardo Wagner de Almeida VITOR & Egler CHIARI

RESUMO

Para aprimorar a sensibilidade e a especificidade da reação de hemaglutinação indireta no diagnóstico da doença de Chagas, foram utilizados eritrócitos sensibilizados com antígeno de epimastigotas de diferentes amostras (clones A1.7, B12, C1 e cepas D150 e Y), de tripomastigotas metacíclicos de cultura (TMC) e de tripomastigotas de cultura de células (TCC) do *Trypanosoma cruzi*. Foram titulados 132 soros de indivíduos chagásicos e 161 soros de não chagásicos, diagnosticados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), considerada como reação de referência no cálculo dos índices de co-positividade (i.c.p.), co-negatividade (i.c.n.) e concordância. Utilizando o título discriminante (T.D.) de 1:40, os antígenos da cepa Y e do clone B12 apresentaram valores elevados para os três índices calculados, indicando boa sensibilidade e especificidade em relação à RIFI. Os antígenos dos clones A1.7 e C1 apresentaram baixa especificidade considerando o T.D. de 1:40, mas ocorreu um aumento acentuado para o i.c.n. considerando o T.D. de 1:80, indicando um aumento de especificidade relativa sem alteração significativa da sensibilidade relativa. Com os antígenos T.M.C. e T.C.C. foram observados títulos mais baixos e valores menores para o i.c.p., indicando pouca sensibilidade em relação à RIFI.

UNITERMOS: Doença de Chagas; Diagnóstico; Sorologia; Hemaglutinação indireta.

INTRODUÇÃO

Variados esforços têm sido realizados na tentativa de elevar a sensibilidade e a especificidade de reações sorológicas utilizadas no diagnóstico da doença de Chagas, aplicando prováveis diferenças antigênicas observadas entre amostras e formas evolutivas do *T. cruzi*. Para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os melhores resultados foram observados com antígeno de tripomastigotas sanguíneos⁵ ou com amastigotas⁶. A reação de fixação de complemento apresentou resultados concordantes com antígeno de cinco diferentes cepas¹³, mas foi mais sensível com antígeno de amastigotas¹⁵. A reação de hemaglutinação indireta

(RHI) também apresentou resultados concordantes com antígeno de duas cepas do *T. cruzi*¹⁴, mas foi ligeiramente mais sensível com antígeno obtido de cultura com predomínio de tripomastigotas³. Mais recentemente, ARAÚJO e GUPTILL¹ avaliaram antígenos de epimastigotas e amastigotas pela RIFI e ELISA, observando títulos mais altos com antígenos derivados de amastigotas em ambos os testes. A utilização de técnicas de imunoprecipitação com soros humanos infectados permitiu ainda que estes autores observassem que a quantidade de antígenos na preparação de amastigotas é maior que na preparação de epimastigotas.

Neste trabalho apresentamos resultados da RHI, utilizando antígeno de epimastigotas de amostras clonadas ou não, de tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas de cultura de células, visando elevar tanto a sensibilidade como a especificidade da RHI no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de Soros

As amostras de soros foram colhidas de 132 indivíduos chagásicos diagnosticados pela RIFI para doença de Chagas e de 161 indivíduos não reagentes pela RIFI, incluindo indivíduos com outras infecções parasitárias: leishmaniose mucosa tegumentar, amebíase, cisticercose, toxoplasmose e esquistossomose mansoni. As amostras de soro foram divididas em alíquotas e conservadas a -20°C até o uso.

Reação de Hemaglutinação Indireta

A metodologia empregada na extração de antígeno foi de acordo com HOSHINO-SHIMIZU e col.¹¹, que utilizaram uma extração alcalina por NaOH 0,15 M. Os procedimentos para sensibilização dos eritrócitos e execução das reações também foram de acordo com os autores acima citados. Os antígenos utilizados foram extraídos de epimastigotas das seguintes amostras do *T. cruzi*: clone Al.7 (clone F2 da cepa 229), clone B12 (clone F1 da cepa 167), clone C1 (clone F1 da cepa 182) e da cepa D150. O isolamento destas cepas foi por hemocultura⁸ de pacientes chagásicos crônicos de Bambuí (MG) e os clones obtidos segundo metodologia descrita por GOLDBERG & CHIARI¹⁰. As quatro amostras foram tipadas por determinação do perfil eletroforético de isoenzimas, apresentando respectivamente os perfis A, B, C e D¹⁶. Foram ainda utilizados extratos antigênicos de tripomastigotas de cultura de células (T.C.C.), de epimastigotas da cepa Y¹⁷ e de tripomastigotas metacíclicos de cultura (T.M.C.) do clone Y4, clone F1 da cepa Y com alto potencial de diferenciação.

Para obtenção de massa de epimastigotas, os flagelados foram cultivados em meio líquido ("LIT") por um período de 5 a 8 dias. Os T.M.C. foram obtidos através de cultivo do clone Y4 no meio M16⁷ por um período de 6 a 8 dias.

Este clone apresenta alta taxa de metaciclogênese quando semeado em meio empobrecido, alcançando até 90% de formas tripomastigotas. Os T.C.C. foram obtidos do cultivo contínuo da cepa Y em células "VERO", mantida por passagens semanais em Meio 199 e separados no 5.º ou 6.º dia de infecção⁹. Todos os flagelados obtidos foram lavados por três vezes a frio em solução NaCl 0,15 M e, após avaliação diferencial tripomastigota/epimastigota através de esfregaço, foram estocados a -20°C até o momento em que foram liofilizados. Após a extração do antígeno, a concentração de proteínas foi avaliada segundo o método de LOWRY e col.¹², utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Reação de Imunofluorescência Indireta

Foi executada de acordo com CAMARGO⁵, sendo utilizada como reação de referência na determinação de anticorpos circulantes anti-*T. cruzi* no cálculo dos índices de co-positividade e co-negatividade⁴.

Análise Estatística

As médias geométricas da recíproca dos títulos positivos foram calculadas utilizando títulos codificados. A significância da diferença entre médias geométricas de títulos foi verificada por análise de variância e cálculo da diferença média significativa (DMS), conforme ARMITAGE².

RESULTADOS

A avaliação da porcentagem aproximada de tripomastigotas metacíclicos nas culturas utilizadas para extração de antígeno apresentou os seguintes resultados: clone Al.7, 39%; clone B12, 25%; clone C1, 0%; cepa D150, 1%; clone Y4, 90%; cepa Y cultivada em "LIT", 10%. A cepa Y cultivada em células "VERO" apresentou 95% de T.C.C.

A concentração mínima ideal de proteínas para sensibilizar os eritrócitos variou entre 15 e 30 microgramas por mililitro, independente da amostra utilizada para extração de antígeno.

A Tabela I mostra a distribuição da frequência dos títulos de anticorpos em 293 soros para a RHI com eritrócitos sensibilizados com os extratos antigênicos das amostras Al.7, B12.

Cl e D150. A maior parte dos soros positivos pela RIFI apresentou títulos variando entre 1:80 e 1:640 pela RHI, enquanto a maioria dos soros negativos pela RIFI apresentou também

resultados negativos pela RHI, com exceção dos antígenos dos clones Al.7 e Cl, onde ocorreu um elevado número de reações falso-positivas na diluição 1:40.

TABELA I

Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos pela reação de hemaglutinação indireta em 293 soros, de acordo com o antígeno utilizado (amostras do *T. cruzi*)

| Antígeno | RIFI (Reação de Referência) | Recíproca dos títulos pela RHI | | | | | | | | Total | MGRT* | |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|----|----|----|-----|-----|-----|------|-------|-------|------|
| | | <20 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | | | 2560 |
| Clone Al.7 | Positiva | — | 1 | 3 | 13 | 39 | 56 | 19 | 1 | — | 132 | 234 |
| | Negativa | 30 | 95 | 30 | 4 | 2 | — | — | — | — | 161 | |
| Clone B12 | Positiva | — | 2 | 4 | 29 | 42 | 39 | 13 | 3 | — | 132 | 186 |
| | Negativa | 67 | 88 | 5 | 1 | — | — | — | — | — | 161 | |
| Clone Cl | Positiva | — | 1 | 5 | 19 | 34 | 50 | 21 | 2 | — | 132 | 224 |
| | Negativa | 37 | 96 | 23 | 4 | 1 | — | — | — | — | 161 | |
| Cepa D150 | Positiva | 2 | 6 | 15 | 34 | 32 | 12 | — | — | — | 132 | 135+ |
| | Negativa | 74 | 77 | 8 | 1 | 1 | — | — | — | — | 161 | |

* Média geométrica da recíproca dos títulos positivos

+ MGRT significativamente menor que as outras médias ($F = 13,45$; $p < 0,05$; $DMS = 0,08$)

Através da Tabela II podemos observar os índices de co-positividade, co-negatividade e concordância calculados em relação à RIFI, utilizando eritrócitos sensibilizados com extratos an-

tigênicos das amostras Al.7, B12, Cl e D150, considerando como título discriminante as diluições 1:20, 1:40 e 1:80.

TABELA II

Avaliação da sensibilidade e especificidade da RHI em relação à RIFI, de acordo com a amostra utilizada para extração de antígeno, através dos índices de co-positividade, co-negatividade e concordância para 293 soros analisados

| Antígeno | Título | Índice | | |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Discriminante | Co-positividade | Co-negatividade | Concordância (%) |
| Clone Al.7 | 1:20 | 1,0000 | 0,1863 | 55,29 |
| | 1:40 | 0,9924 | 0,7764 | 87,37 |
| | 1:80 | 0,9697 | 0,9673 | 96,59 |
| Clone B12 | 1:20 | 1,0000 | 0,4161 | 67,92 |
| | 1:40 | 0,9848 | 0,9627 | 97,27 |
| | 1:80 | 0,9545 | 0,9938 | 97,61 |
| Clone Cl | 1:20 | 1,0000 | 0,2298 | 57,68 |
| | 1:40 | 0,9924 | 0,8261 | 90,10 |
| | 1:80 | 0,9545 | 0,9689 | 96,25 |
| Cepa D150 | 1:20 | 0,9848 | 0,5404 | 74,06 |
| | 1:40 | 0,9394 | 0,9379 | 93,86 |
| | 1:80 | 0,8258 | 0,9876 | 91,47 |

Utilizando eritrócitos sensibilizados com antígeno dos clones Al.7 e Cl, foi observado um número elevado de reações cruzadas em soros de indivíduos com esquistossomose e toxoplasmose, além de alguns casos isolados de reações cruzadas em soros de indivíduos com leishmaniose mucocutânea, amebíase e cisticercose na diluição 1:40 (dados não apresentados).

A RHI com antígeno de epimastigotas da cepa Y apresentou títulos variando entre 1:20 e 1:1280 para os soros de indivíduos chagásicos. Com antígeno de tripomastigotas, os títulos variaram entre 1:20 e 1:320 (Tabela III).

Foram ainda calculados os índices de co-positividade, co-negatividade e concordância para a RHI em relação à RIFI, considerando como

T A B E L A III

Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos pela reação de hemaglutinação indireta em 293 soros, de acordo com o antígeno utilizado (formas evolutivas da cepa Y)

| Antígeno | RIFI (Reação de Referência) | Recíproca dos títulos pela RHI | | | | | | | | Total | MGRT* | |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----|----|----|-----|-----|-----|------|-------|-------|------|
| | | <20 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | | | 2560 |
| Epimastigotas da cepa Y | Positiva | 1 | 3 | 9 | 22 | 36 | 41 | 18 | 2 | — | 132 | 186+ |
| | Negativa | 75 | 78 | 7 | — | 1 | — | — | — | — | 161 | |
| T.M.C. do clone Y4 | Positiva | 6 | 7 | 29 | 27 | 37 | 21 | 5 | — | — | 132 | 98 |
| | Negativa | 111 | 48 | 1 | 1 | — | — | — | — | — | 161 | |
| T.C.C. da cepa Y | Positiva | 10 | 11 | 32 | 36 | 34 | 9 | — | — | — | 132 | 71 |
| | Negativa | 144 | 17 | — | — | — | — | — | — | — | 161 | |

* Média geométrica da recíproca dos títulos positivos

+ MGRT significativamente maior que as outras médias ($F = 42,15$; $P < 0,05$; $DMS = 0,09$)

título discriminante às diluições de 1:20, 1:40 e 1:80 e utilizando eritrócitos sensibilizados com extratos antigênicos de epimastigotas, TMC e TCC (Tabela IV). Não foi observado um número significativo de reações inespecíficas cruzadas em soros de indivíduos com outras infecções utilizando antígeno de tripomastigotas e

título discriminante de 1:40. Com antígeno de epimastigotas da cepa Y foram observados 6 casos de reações cruzadas em soros de indivíduos com toxoplasmose crônica, diagnosticados pela RIFI (IgG) e apresentando títulos entre 1:16 e 1:1024 (dados não apresentados).

T A B E L A IV

Avaliação da sensibilidade e especificidade da RHI em relação à RIFI, de acordo com a forma evolutiva utilizada para obtenção do antígeno, através dos índices de co-positividade, co-negatividade e concordância para 293 soros analisados

| Antígeno | Título | | Índice | | |
|-------------------------|---------------|--|-----------------|-----------------|------------------|
| | Discriminante | | Co-positividade | Co-negatividade | Concordância (%) |
| Epimastigotas da cepa Y | 1:20 | | 0,9924 | 0,4653 | 70,31 |
| | 1:40 | | 0,9697 | 0,9503 | 95,90 |
| | 1:80 | | 0,9015 | 0,9938 | 95,22 |
| T.M.C. do clone Y4 | 1:20 | | 0,9545 | 0,6894 | 80,89 |
| | 1:40 | | 0,9015 | 0,9876 | 94,88 |
| | 1:80 | | 0,6818 | 0,9938 | 85,32 |
| T.C.C. da cepa Y | 1:20 | | 0,9242 | 0,8944 | 90,78 |
| | 1:40 | | 0,8409 | 1,0000 | 92,83 |
| | 1:80 | | 0,5985 | 1,0000 | 81,91 |

DISCUSSÃO

A distribuição da frequência dos títulos positivos pela RHI com antígeno de epimastigotas de qualquer das cepas ou clones foi muito semelhante, variando, em sua maioria, entre 1:20 e 1:1280. Utilizando antígeno de tripomastigotas foi observado uma queda significativa na média geométrica da recíproca dos títulos, provavelmente em consequência de um menor potencial antigênico para estes estágios.

Não há indícios de que as diferenças observadas na distribuição dos títulos tenham importância clínica ou epidemiológica, pois o nível de

anticorpos em um indivíduo chagásico não é indicativo da fase da doença em que se encontra. Mais importante seria determinar a diluição mínima capaz de distinguir os verdadeiros soros reativos e não reativos. Pelos resultados obtidos podemos observar que os antígenos de epimastigotas da cepa Y e do clone B12 podem ser utilizados para a RHI com título discriminante de 1:40, pois nesta diluição mostraram valores elevados para os três índices calculados, indicando boa sensibilidade e especificidade em relação à RIFI. Os antígenos dos clones A1.7 e CI (39 e 0% de T.M.C., respectivamente) não foram suficientemente específicos, utilizan-

do o título discriminante de 1:40, mas houve um aumento significativo do índice de co-negatividade, considerando a diluição de 1:80, sem alteração significativa do índice de co-positividade, não havendo neste caso, correlação entre a porcentagem de tripomastigotas nas amostras estudadas e a especificidade ou sensibilidade do antígeno obtido.

A RHI com antígeno de T.M.C. apresentou melhores resultados na diluição de 1:40, apesar do baixo valor para o índice de co-positividade, indicando pouca sensibilidade relativa. O antígeno obtido de epimastigotas da cepa Y (10% de tripomastigotas metacíclicas) foi notadamente mais sensível que o antígeno de T.M.C. do clone Y4 (90% de tripomastigotas metacíclicas). Neste caso, portanto, nota-se uma correlação entre a porcentagem de epimastigotas e a sensibilidade do antígeno obtido. Entretanto, os resultados obtidos com os clones A1.7 e C1 devem ser considerados, apesar de não se observar esta correlação. Possivelmente estes resultados estejam também relacionados ao comportamento apresentado por amostras de *T. cruzi* pertencentes à diferentes zimodemas, sendo necessários estudos adicionais a nível bioquímico e imunológico.

Os resultados obtidos por BATISTA³ apresentam um antígeno extraído de cultura com predomínio de T.M.C. como mais sensível que epimastigotas, resultados contrários aos aqui relatados. Seria importante, entretanto, ressaltar que este autor utilizou altas concentrações de proteína na sensibilização dos eritrócitos (350 microgramas de proteína por mililitro) devido ao uso de métodos inadequados de extração por tratamento com água destilada, o que explicaria a presença de moléculas protéicas inespecíficas não sensibilizantes nos extratos antigênicos. Por outro lado, esta maior sensibilidade somente foi observada por aquele autor em diluições acima de 1:1280. A RHI com antígeno de T.M.C. e T.C.C. apresentou boa especificidade relativa.

Todos os antígenos extraídos de epimastigotas apresentaram algumas reações cruzadas quando testados contra soros de indivíduos com outras infecções, sendo que os resultados mais significativos foram observados com antígeno dos clones A1.7 e C1, que apresentaram reatividade cruzada, principalmente em indivi-

duos com toxoplasmose e esquistossomose (dados não apresentados). Os resultados obtidos sugerem uma maior riqueza de determinantes antigênicos inespecíficos comuns entre os clones A1.7 e C1 e os agentes etiológicos da toxoplasmose e esquistossomose.

SUMMARY

Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination test. II. Different stocks and evolutive forms

To improve sensitivity and specificity of the indirect hemagglutination test (IHA) for Chagas' disease serodiagnosis, different antigens of *Trypanosoma cruzi* extracts from epimastigotes (A1.7, B12 and C1 clones; Y and D150 strains) and from trypomastigotes (metacyclics and tissue cell cultures) were tested. Sera of 132 individuals with chronic Chagas' disease, demonstrated by immunofluorescence test (IFT) and sera of 161 non chagasic individuals were assayed. The IFT was the reference test to evaluate the co-positivity index (c.p.i.) and co-negativity index (c.n.i.). The antigens of Y strain and B12 clone presented high values for the calculated index with a cut off of 1:40, suggesting sensitivity, specificity and agreement of IHA in relation to IFT. Antigens of A1.7 and C1 clones presented high values for the calculated index only with a cut off of 1:80. Titers presented by sera from chagasics tested by IHA with trypomastigote antigens were lower than those with epimastigote antigens. Trypomastigote antigens gave lower values for co-positivity index, suggesting little sensitivity in relation to IFT.

AGRADECIMENTOS

A Cléa de Andrade Chiari, pela ajuda na realização do presente trabalho, a Lúcia M. C. Galvão, pela gentileza em nos ceder os tripomastigotas de cultura de células, ao Paul Williams, pela revisão do resumo em inglês e aos laboratoristas Afonso da Costa Viana e Orlando Carlos Magno, pela ajuda técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO, F. G. & GUPTILL, D. — Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. Amer. J. trop. Med. Hyg., 33: 362-371, 1984.

2. ARMITAGE, P. — Statistical methods in medical research. 4th. ed. London, Blackwell Scientific Publication, 1977. p. 217-232.
3. BATISTA, S. M. — Teste de hemaglutinação com diferentes antígenos no diagnóstico da doença de Chagas. Belo Horizonte, 1973. (Tese — Universidade Federal de Minas Gerais).
4. BUCK, A. A. & GART, J. J. — Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Amer. J. Epidem.*, 83: 586-592, 1966.
5. 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.
6. 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. S. Paulo*, 13: 162-166, 1971.
7. CHIARI, E. — Diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em cultura. Belo Horizonte, 1981. (Tese — Universidade Federal de Minas Gerais).
8. 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, 1978. Anais. p. N1-5.
9. GALVÃO, L. M. C.; BRENER, Z. & KRETTLI, A. U. — Continuous cell cultures for the production of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes (Try). In: REUNIAO ANUAL SOBRE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 10a., Caxambu, Minas Gerais, Brasil, 1983. Resumos. p. B164.
10. GOLDBERG, S. S. & CHIARI, E. — Growth and isolation of single colonies of *Trypanosoma cruzi* on solid medium. *J. Parasit.*, 66: 677-679, 1980.
11. HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. E.; NAGASE, T. K. — A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20: 208-212, 1978.
12. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
13. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação de complemento. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 41: 303-333, 1944.
15. NEAL, R. A. & MILES, R. A. — Indirect haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 12: 325-332, 1970.
15. NEVA, F. A. & GAM, A. A. — A complement-fixing antigen from *Trypanosoma cruzi* grown in cell cultures. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 26: 37-46, 1977.
16. ROMANHA, A. J. — Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Belo Horizonte, 1982. (Tese — Universidade Federal de Minas Gerais).
17. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia clín. biol. (S. Paulo)*, 20: 191-208, 1953.

Recebido para publicação em 27/11/1986.