

## HIPERSENSIBILIDADE TARDIA A ANTÍGENO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. II - EMPREGO DO TESTE CUTÂNEO COM ANTÍGENO T12E PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Antonio R.L. Teixeira, Florêncio Figueiredo e Jofre Rezende Filho

*Reações cutâneas de hipersensibilidade tardia ao antígeno T12E foram identificadas em 35,7% da amostra de 842 indivíduos do município de Mambai, Goiás. Suas especificidade e sensibilidade foram comparadas com aquelas dos exames sorológicos. Em 94 pacientes chagásicos comprovados pelo xenodiagnóstico, o teste cutâneo foi positivo em 98,7% dos casos, a imunofluorescência em 97,8% e a fixação do complemento em 80,6%. A hemaglutinação foi positiva em todos esses casos. O índice de 0,897 mostrou a estreita relação entre os percentuais positivos dos exames de hemaglutinação e de imunofluorescência com o teste cutâneo, nos chagásicos sem comprovação parasitológica. Esse dado indica que em aproximadamente 90% dos casos os resultados desses três exames são concordantes. A quantidade de 50µg do antígeno T12E empregada no teste cutâneo não apresentou efeitos colaterais e não produziu conversão das provas imunológicas, mesmo quando foi repetido cinco vezes em voluntários sadios, em intervalos de 15 dias. A potência do antígeno permaneceu inalterada após a estocagem a -10°C, durante 24 meses.*

*Palavras-chaves: Intradermorreação. Antígeno T12E. Hipersensibilidade tardia. Doença de Chagas.*

As reações cutâneas de hipersensibilidade tardia a antígenos de microorganismos são empregadas rotineiramente para diagnóstico de infecções crônicas, tais como tuberculose, hanseníase e leishmaniose. Existe interesse de epidemiologistas, clínicos, parasitologistas e imunologistas no estabelecimento do diagnóstico das infecções pelo *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas, através de método simples e eficaz. Ainda que alguns trabalhos<sup>3 12 13 14</sup> tenham indicado a possibilidade de utilização da intradermorreação com antígeno de *T. cruzi* para diagnóstico da doença de Chagas, não foi

feito emprego sistematizado de um teste cutâneo com tal finalidade.

Em trabalho prévio<sup>10</sup>, foi descrito o método de obtenção do antígeno T12E, derivado de um clone do estoque Ernestina de *T. cruzi*. Esse antígeno foi capaz de desencadear reações cutâneas de forte intensidade em coelhos chagásicos crônicos, e sua especificidade foi indicada pela ausência de reação nos coelhos normais. A inocuidade do teste cutâneo com antígeno T12E foi demonstrada pela inexistência de soroconversão ou de indução de reação cutânea nos coelhos controles após série de cinco testes com intervalos de uma semana. Em adição, coelhos chagásicos submetidos a cinco injeções intradérmicas de 50µg de proteína em 100µl do antígeno T12E não aumentaram a intensidade das reações cutâneas ou os títulos dos anticorpos séricos específicos. Em outros experimentos, foi demonstrado que os registros eletrocardiográficos de coelhos chagásicos submetidos a testes cutâneos a cada trinta dias, pelo período de um ano, não apresentaram aumento da frequência de alterações do ECG, quando comparadas com aquelas registradas em coelhos chagásicos que não foram

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília-DF. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP e Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Goiás, GO. Este estudo foi patrocinado pelo Central de Medicamentos, CEME, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Antonio R. L. Teixeira. Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Caixa Postal 04-685. 70919-970, Brasília-DF. Brasil. Fax: (061) 273-4645.

Recebido para publicação em 25/01/95.

submetidos aos testes. No grupo controle, coelhos normais não apresentaram alterações do ECG após série paralela de testes cutâneos com esse antígeno<sup>10</sup>.

Em vista dos achados descritos na literatura<sup>3 10 12 13 14</sup>, foi feita análise do emprego do teste cutâneo com o antígeno T12E em uma população de área endêmica de doença de Chagas, no norte do Estado de Goiás. Os resultados desse estudo mostram que a intradermorreação é um método simples e eficaz para diagnóstico da doença de Chagas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Antígeno

O antígeno T12E, derivado de formas epimastigotas de um clone do estoque Ernestina de *T. cruzi*, foi produzido de acordo com método descrito em trabalho prévio<sup>10</sup>. O antígeno foi envasado em "vacutainer" com técnica asséptica, na concentração de 500µg de proteína/ml. Em cada lote de antígeno eram tomados, aleatoriamente, tubos para controle de qualidade, que consistiu em provas de esterilidade e de pirogênio. A esterilidade foi determinada pelo cultivo de 1ml do antígeno em LIT, e exame microscópico do meio de cultura dez dias depois. O teste de exclusão de efeito pirogênico foi feito através de injeção de 100µg do antígeno em 100µl de salina, na veia da cauda de camundongos albinos Suíços. A temperatura retal era medida com termômetro, nas 8h subseqüentes. Qualquer elevação da temperatura corporal do animal indicava o descarte daquele lote de antígeno.

Os lotes de antígeno aprovados no controle de qualidade eram mantidos no congelador a -10°C. Foram feitos testes pareados de potência do antígeno recém-preparado e daquele guardado à baixa temperatura, a cada 2 meses pelo período de 24 meses, em coelhos chagásicos crônicos<sup>10</sup>.

### Teste cutâneo

O antígeno T12E era descongelado imediatamente antes do uso. A quantidade de 50µg de proteína contida em 100µl de salina estéril era injetada na face anterior do antebraço com seringa e com agulha descartável do tipo PPD. Na ocasião, o indivíduo era solicitado a retornar 48h depois, para leitura da reação.

Em um estudo piloto, os indivíduos foram solicitados a retornar 24 e 48h após o teste, para estabelecimento do período adequado para a leitura. Essa era feita por inspeção do local, seguida de palpação para delimitar a área endurecida de reação ao antígeno. Os limites da reação eram demarcados com caneta esferográfica. Os maiores diâmetros da reação eram medidos com régua milimetrada.

### Amostragem

- a) Indivíduos sem exposição prévia ao *T. cruzi*: a análise da inocuidade do antígeno T12E foi feita em 12 indivíduos residentes em Brasília. Esses indivíduos tinham associação com a pesquisa e se apresentaram, voluntariamente, para fazer o teste cutâneo.
- b) Indivíduos de área endêmica: essa parte do estudo foi feita em residentes do município de Mambaí, Goiás, área endêmica de doença de Chagas. A infra-estrutura para execução do trabalho, como posto médico, viaturas e auxílio de pessoal de campo foi colocada a nossa disposição pelo Professor Aluizio Prata. Os testes eram feitos à medida que os indivíduos iam ao posto médico da cidade em busca de consulta, ou em visita da equipe médica aos habitantes da zona rural. Em nenhuma ocasião fez-se o teste cutâneo sem consentimento expresso do chefe da família.

A amostra foi formada de 342 indivíduos. Desses, 26,6% tinham entre 1 e 9 anos de idade, 23,8% entre 10 e 19 anos, 14,1% entre 20 e 21 anos, 12,2% entre 30 e 39 anos, 6,3% entre 40 e 49 anos, 4,9% entre 50 e 59 anos, 3,0% entre 60 e 69 anos e 1,3% acima de 70 anos. Da amostra, 7,8% não tinham idade referida. A distribuição dos percentuais reflete o predomínio dos jovens na composição da população daquele município. Um estudo parasitológico prévio<sup>5</sup> mostrou que 94 pacientes chagásicos dessa amostragem tinham xenodiagnóstico positivo.

### Colheita de sangue

Colheu-se 3ml de sangue venoso de cada indivíduo, com seringa descartável, antes da injeção do antígeno. Em 276 casos, colheu-se sangue novamente 21 dias depois da injeção do antígeno. O sangue era deixado coagular à temperatura ambiente. Aproximadamente, 1,5ml de soro era, então, colhido com pipeta

de Pasteur. A amostra de soro era dividida em duas alíquotas, e guardadas no refrigerador a 4°C, ou no congelador a -10°C.

## Exames sorológicos

- a) Fixação do Complemento (FC): a técnica qualitativa em placas, descrita por Almeida<sup>1</sup>, foi empregada nesse estudo. Os volumes dos reagentes foram: 10µl de soro humano inativado a 56°C por 30min; 20µl de antígeno metílico (Lio-Serum, Ribeirão Preto, SP); 20µl de diluição de soro de cobaia contendo 3,5UH<sub>50%</sub> de Complemento; 40µl de uma suspensão de hemácias de carneiro a 0,5% sensibilizadas com 2 unidades de hemolisina. A reação procedeu a 37°C por hora e meia e depois a 4°C por 10min. Soros positivos e negativos serviram de controle da sensibilidade da reação. Considerou-se positiva uma reação com título igual ou maior que 1:64.
- b) Hemaglutinação indireta (HI): extrato solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* foi usado para sensibilizar hemácia humana do grupo sanguíneo O e Rh<sup>-</sup>, de acordo com o método descrito por Cerisola e cols<sup>7</sup>. Após sensibilização das hemácias tanizadas com o antígeno, fazia-se suspensão dos eritrócitos a 1% com mistura de três soros (v/v) normais em salina. Os testes foram feitos em diluições duplas em placas de microtitulação. Soros positivos e negativos eram incluídos como controle da reação. Considerou-se positiva uma reação com título igual ou maior que 1:8.
- c) Imunofluorescência indireta (IF): a técnica de imunofluorescência indireta descrita por Camargo<sup>4</sup>, foi empregada nesse estudo. O teste em lâmina teve como substrato formas epimastigotas tripsinizadas e fixadas em formaldeído. Os soros foram testados na diluição 1:20. Usou-se conjugado anti-IgG humana fluoresceinada (Cappel Laboratories, USA). As lâminas foram examinadas com microscópio Olympus HB, com objetiva planapocromática de 40x, condensador de campo escuro e lâmpada a vapor de mercúrio HBO 220w, com filtros de absorção e excitação OG<sup>2</sup>. A reação positiva era indicada pela fluorescência verde-maçã característica na silhueta do parasito.

## RESULTADOS

Verificou-se que a potência do antígeno T12E permaneceu inalterada após 24 meses de

estocagem a -10°C. A injeção intradérmica de 50µg de proteína em 100µl do antígeno T12E produziu pápula eritematosa no sítio de injeção no indivíduo chagásico. Em alguns casos, o eritema tornava-se nítido 1h após e aumentava nas horas subsequentes. A intensidade da reação era maior no dia seguinte, quando começava a coçar. Raramente, os chagásicos referiam a moleza no corpo e febrícula. Por volta de 24h já era nítida a característica endureção local, que podia aumentar de intensidade após 48h. A partir de então, o eritema evanesce e a endureção diminuía progressivamente de tamanho.

A área de reação era indicada, na quase totalidade dos casos, pela inspeção do eritema. Nos indivíduos de cor negra o eritema podia não ser delimitado e a reação era indicada apenas pela endureção (Figura 1). O pinçamento da pele com o polegar e indicador era fundamental para definir a área de textura endurecida. Sua demarcação podia ser feita com a ponta de caneta esferográfica correndo sobre a pele, em ângulo oblíquo, de fora para o centro da reação, nos eixos longitudinal e transversal do braço. A área assim delimitada era medida com régua.



Figura 1 - Reação cutânea endurecida no braço de uma jovem, 48h após a injeção de 50µg de proteína em 100µl do antígeno T12E. A paciente tinha exames sorológicos de hemaglutinação e de imunofluorescência positivos. Note a pápula eritematosa endurecida, medindo 2,5x2,5cm nos eixos longitudinal e transversal.

Entre os 842 indivíduos submetidos ao teste cutâneo, foram encontrados 31 com reações medindo de 0,8 a 1,2cm. Dezessete desses casos tiveram resultados de exames sorológicos negativos, enquanto os demais

quatorze tiveram dois ou mais exames positivos. A Tabela 1 mostra a distribuição dos resultados de exames sorológicos positivos e negativos em relação à intensidade da reação cutânea ao antígeno T12E.

Tabela 1 - Determinação do ponto de corte de resultados de exames sorológicos e de reação cutânea ao antígeno T12E\*.

Exames sorológicos	Diâmetro reação cutânea	% concordância	Total casos
Negativos	0,8±0,2	78,9	15/19
Positivos	1,1±0,2	83,3	10/12

\* Quatro indivíduos com testes sorológicos negativos tiveram reação cutânea ao antígeno T12E medindo 0,8±0,2cm. dois indivíduos com testes sorológicos positivos tiveram reação cutânea menor que 1,1±0,2cm nos maiores diâmetros.

A concordância de reações cutâneas, medindo igual ou acima de 1cm nos maiores diâmetros, com resultados de exames sorológicos positivos foi de 83,3% (Tabela 1). Esse percentual sugeriu que o ponto de corte entre resultados positivo e negativo era indicado pelos diâmetros de uma reação cutânea igual ou maior a 1cm. A análise dos resultados obtidos nessa coorte populacional permitiu, pois, separar resultados de testes cutâneos positivos e negativos na área endêmica estudada.

O tempo ideal para prodecer a leitura foi procurado pela análise dos testes cutâneos em 200 indivíduos com resultados concordantes de três exames sorológicos, cujas reações foram medidas 24 e 48h após injeção do antígeno. A Tabela 2 mostra os resultados dessa análise.

Tabela 2 - Determinação do tempo ideal para leitura do teste cutâneo positivo com o antígeno T12E\*.

Sorologia	Total	Teste cutâneo	
		24h	48h
Negativa	135	120	135
Positiva	65	65	65

\* Foram feitos exames de fixação do Complemento, hemaglutinação e imunofluorescência (vide métodos). O teste cutâneo consistiu na injeção intradérmica de 50µg do antígeno.

A análise dos dados da Tabela 2 mostra que a leitura do teste cutâneo 48h após a injeção do antígeno permite melhor identificação de chagásicos que com 24h. Em vista desses resultados, estabeleceu-se a leitura deste teste cutâneo após 48h.

A Tabela 3 mostra que o teste cutâneo, com leitura da reação 48h após a injeção do antígeno T12E, identificou 301 (35,7%), chagásicos entre os 842 indivíduos desse

estudo. A Tabela 4 mostra a grande proximidade de percentuais de casos positivos, quando foram usados HI (36,0%), IF (35,0%) e FC (35,3%). Os resultados também mostram uma estreita aproximação entre percentuais de chagásicos identificados com cada um dos três exames sorológicos empregados e, destes com os 35,7% identificados com o teste cutâneo. Entretanto, foram encontrados 356 indivíduos (42,2% da amostra) com um dos três exames sorológicos positivo. Esse percentual é largamente discrepante em relação àqueles obtidos com cada um dos testes tomados separadamente.

Tabela 3- Resultado do teste cutâneo em 842 indivíduos de área endêmica\*.

Teste cutâneo	Resultados	%
Positivo	301	35,7
Negativo	541	64,3
Total	842	100,0

\* Foi considerada positiva reação endurecida medindo um ou mais centímetros nos maiores diâmetros.

Em vista dos resultados discrepantes de exames sorológicos, houve necessidade de combinar resultados de dois ou mais exames para identificação do portador da infecção chagásica. Verifica-se na Tabela 4 que houve variação entre os percentuais de casos positivos, conforme a combinação de métodos empregada. Enquanto a combinação de HI com IF forneceu 33,0% de casos positivos, IF e FC foram positivas em 26,7% dos casos. Com os três exames positivos foram encontrados 26% dos indivíduos da amostra. A diminuição dos percentuais de resultados concordantes foi observada toda vez que se juntaram à HI ou IF os resultados da FC.

Tabela 4 - Análise dos resultados de exames sorológicos, isoladamente ou em combinações, e co-positividade com o teste cutâneo.

Estudo sorológico	Resultados*	%	Índice de co-positividade**
Pelo menos um dos três exames positivos	356/842	42,2	1,182
Com um exame positivo			
HI	298/838	35,6	0,997
IF	292/834	35,0	0,980
FC	264/748	35,3	0,988
Com dois exames positivos			
HI e IF	274/830	33,0	0,924
IF e FC	209/830	26,7	0,747
FC e HI	218/781	27,9	0,781
Com os três exames positivos	203/781	26,0	0,728

\* Número de casos positivos/número de soros examinados. Foram feitos os exames de hemaglutinação (HI); imunofluorescência (IF) e fixação do Complemento (FC).

\*\* índice de co-positividade = % de casos positivos em um ou mais testes sorológicos/% de casos positivos no teste cutâneo.

Em conjunto, o estudo sorológico mostra que os exames HI e IF forneceram resultados consistentemente mais concordantes que aqueles obtidos pela FC. Por exemplo, os resultados combinados de HI e IF apresentaram índice de co-positividade de 0,926 em relação a HI e de 0,942 em relação a IF. Enfim, os resultados combinados de FC e HI tiveram índice de co-positividade de 0,783 em relação a HI, enquanto que aqueles de FC e IF deram índice de 0,762 em relação a IF. Em vista desses resultados, foram considerados para comparação com os resultados do teste cutâneo os percentuais obtidos com os exames combinados de HI e IF, que tiveram melhores índices de co-positividade. Em resumo, essa análise mostrou aumento das discrepâncias conforme se alinhasssem resultados cumulativos de cada exame, ou resultados concordantes de dois exames. Embora os resultados analisados mostrassem resultados falso-positivos e falso-negativos com os exames sorológicos empregados, esse critério serviu de base para a análise da sensibilidade do teste cutâneo.

Enfim, a concordância real entre resultados obtidos com exames sorológicos e o teste cutâneo está apresentada na Tabela 5. Essa análise foi feita com o conjunto de casos que tinha todos os exames concordantes, ou que tinha o teste cutâneo positivo concordante com resultados de duas sorologias.

Tabela 5 - Concordância de resultados de exames sorológicos com o teste cutâneo.

Resultado*	Total**	%
Concordantes negativos	490/842	58,2
Concordantes positivos	252/842	29,6
Total	739/842	87,8
Discrepante		
com teste cutâneo negativo	51/842	6,4
com teste cutâneo positivo	49/842	5,8
Total	103/842	12,2
Total geral	842/842	100,0

\* Foram considerados resultados concordantes de pelo menos dois exames sorológicos e teste cutâneo.

\*\* Número de exames negativos ou positivos/número de soros examinados.

De maior interesse foi a verificação do teste cutâneo concordante, em 87,8% dos casos, com os resultados de dois ou mais exames sorológicos positivos. Todavia, se tomarmos apenas o percentual de concordância dos testes HI e IF (33,0%, Tabela 4) com aquele do teste cutâneo (29,6%, Tabela 5), a co-positividade alcança 89,7% dos casos.

Por último, a especificidade do teste cutâneo com o antígeno T12E foi comparada com aquela exibida pelos exames sorológicos HI, IF e FC, em 94 pacientes chagásicos com xenodiagnósticos positivos. Observou-se que o teste cutâneo teve maior especificidade que IF e FC. Todavia, teve especificidade menor que HI, único exame a identificar todos os chagásicos dessa amostra. Os resultados desse estudo estão apresentados abaixo.

Tabela 6 - Especificidade de exames imunológicos empregados para diagnóstico da infecção pelo Trypanosoma cruzi.

Exame	Resultado*	%
Hemaglutinação	94/94	100,0
Imunofluorescência	92/94	97,8
Fixação do Complemento	67/83**	80,6
Teste cutâneo	93/94	98,9

\* Número de resultados positivos/número de exames feitos.

\*\* Onze soros tinham efeito anticomplementar.

Os exames sorológicos e o teste cutâneo foram repetidos em amostras de soros de 276 indivíduos, colhidas 21 dias após a primeira, com a finalidade de estudar a reproducibilidade dos métodos empregados nesse estudo. Observaram-se índices de reproducibilidade de 0,985 para HI, de 0,942 para IF, de 0,924 para o teste cutâneo e de 0,903 para FC. Todavia, os índices de co-positividade de resultados combinados de HI ou de IF com FC foram inferiores àquele do teste cutâneo (dados não apresentados).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, o termo especificidade foi usado para definir a capacidade de um teste imunológico de identificar todos os casos de infecção chagásica, confirmados pelo xenodiagnóstico, na amostra estudada. Segundo essa definição, quanto mais específico for o teste, menor será a possibilidade de resultado falso. Por outro lado, o termo sensibilidade foi definido como a capacidade do teste imunológico de identificar o maior número de casos suspeitos da infecção, porém sem comprovação do agente etiológico, na amostra estudada. Assim, quanto mais sensível for o teste, maior será a possibilidade de resultado falso. De acordo com essas definições, as reações cruzadas, falso-positivas, são decorrentes de alta sensibilidade e baixa especificidade do teste empregado.

A primeira etapa desse estudo visou a avaliação da inocuidade do antígeno T12E,

quando injetado na dose de 50µg de proteína em 100µl de salina, via intradérmica. Este estudo foi feito em 12 voluntários que se submeteram a uma série de quatro testes com intervalos de 15 dias. Verificou-se que todos esses indivíduos continuaram com os testes cutâneos negativos, e não houve viragem sorológica indicada por exames HI, IF e FC realizados após o segundo, e após o último teste. Um dos voluntários fez cinco testes cutâneos e teve todos os testes sorológicos negativos para antígenos de *T. cruzi*. Em vista desses resultados e de achados experimentais prévios<sup>5</sup>, foi feita a segunda etapa de avaliação do teste cutâneo com o antígeno T12E, em Mambai, Goiás, área endêmica de doença de Chagas.

Em todos os casos, os indivíduos eram indagados se desejavam fazer o teste cutâneo para avaliar a imunidade para infecção pelo *T. cruzi*, conseqüente da picada do barbeiro. O exame foi feito com adesão voluntária do cidadão com mais de 21 anos, ou com o consentimento do chefe da família, quando se tratava de menores de idade. Somente em duas ocasiões a permissão para fazer o teste não foi obtida. No primeiro caso, o chefe da família estava embriagado e, no segundo, a pessoa estava sob cuidado de curandeiro. O teste foi muito bem aceito por todos que tinham curiosidade de saber do seu estado de "alergia", em decorrência da picada do inseto-vector. Esse aspecto facilitou a colheita da pequena alíquota de sangue em todos os casos.

O teste não produziu efeito colateral em qualquer indivíduo, chagásico ou não. A demarcação da reação, na grande maioria dos indivíduos de pele negra, era feita pelo próprio paciente. Todavia, a palpação da pele na área de reação e no braço contralateral permitia definir melhor a área de endurecimento. O resultado do teste cutâneo com o antígeno T12E, pois, pode ser registrado por auxiliar de serviço de saúde. Aliás, a habilidade técnica necessária para fazer o diagnóstico da doença de Chagas pela intradermoreação é semelhante àquela utilizada para o teste de Mantoux, em paciente portador de tuberculose.

A sensibilidade do teste cutâneo com o antígeno T12E foi indicada pelo percentual de 87,8% de resultados concordantes com os testes empregados para diagnóstico da

infecção pelo *T. cruzi*. Os achados deste estudo mostram que existem casos discordantes, falso-positivos (5,8%) ou falso-negativos (6,4%), dos resultados de exames sorológicos. De interesse, o índice de positividade do teste cutâneo com resultados de HI e IF foi de 0,897. Vários fatores podem influenciar no resultado de exames imunológicos<sup>9</sup>, produzindo as discrepâncias que têm sido descritas neste e em outros trabalhos<sup>11,13</sup>.

Por outro lado, a especificidade do teste cutâneo foi avaliada numa amostra de 94 pacientes chagásicos com prova parasitológica. Neste estudo, o teste cutâneo foi apenas menos específico que a HI, pois deu resultado falso-negativo apenas em um paciente chagásico dessa amostra. Todavia, melhor avaliação da especificidade e da sensibilidade de testes imunológicos deve ser feita em população de indivíduos portadores de várias patologias, que poderiam produzir reações cruzadas com antígenos de *T. cruzi* empregados no teste cutâneo e em exames sorológicos.

Evidentemente, esses dados preliminares devem ser seguidos de outros estudos de avaliação das vantagens operacionais do teste cutâneo, além da confirmação de sua sensibilidade e especificidade. Por outro lado, existem indicações de que a intensidade da reação cutânea ao antígeno T12E seja um indicador de morbidade da doença<sup>5,12</sup>. Em resumo, o teste cutâneo com o antígeno T12E é absolutamente inócua pelos parâmetros de avaliação utilizados. Sua produção não apresenta dificuldade técnica e o controle de qualidade do reagente segue normas padronizadas. A liofilização do antígeno não apresenta vantagem operacional, porque determina perda de potência e, também, porque teria de ser mantido a baixa temperatura. Além disso, a injeção do diluente no frasco para reconstituir o liofilizado criaria oportunidade de contaminar o reagente. Esse aspecto de operacionalidade deve ser considerado, tendo em vista a larga estabilidade do produto que mantém sua potência após 24 meses de estocagem no congelador, a -10°C.

## SUMMARY

*Delayed-type skin reactivity against a Trypanosoma cruzi antigen was elicited in 35.7 per*

cent of the individuals living in the country of Mambai, state of Goiás, Brazil. The specificity of this skin reaction was shown in 93 out of 94 (98.7%) chagasic patients, in whom the parasitemias were detected by xenodiagnosis. In these patients, however, the hemagglutination, immunofluorescence and complement fixation assays were positive in respectively, 100, 97.8 and 80.6 per cent. The relationship between the combined positive results by hemagglutination and immunofluorescence with that obtained with skin testings was 0.897, in the overall population in this study. The quantity of 50µg of protein in 100µl of the T12E antigen did not produce undesired effects, and did not shift the immunologic assays, when healthy volunteers were skin tested five times within 15-day intervals. Also, the potency of this antigen remained unaltered after 24 months at -10°C.

Key-words: T12E antigen. Delayed-type skin hypersensitivity. Chagas' disease.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Aluizio Prata, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, pela utilização da infra-estrutura de campo que estabeleceu em Mambai. À Maria José Gonçalves, pela assistência técnica,

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida JO. Reação quantitativa de fixação de complemento em gotas sobre placas, pelo método das curvas iso-hemolíticas. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 5:176-181, 1963.
2. Almeida JO, Siqueira AF. Estudo de discrepância relativa entre pares de reações simultâneas de fixação do complemento no sistema moléstia de Chagas. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2:204-212, 1960.
3. Amato Neto V, Magaldi C, Pessoa SB. Intradermorreacção para o diagnóstico da doença de Chagas com antígeno de *Trypanosoma cruzi* obtido de cultura de tecido. Revista Goiana de Medicina 10:121-126, 1964.
4. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 8:227-234, 1966.
5. Castro CN. Estudo longitudinal da parasitemia e sua correlação com a evolução clínica. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
6. Cerisola JA, Alvarez M, Lugones H, Rebololán JB. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Boletín Chileno Parasitología 24:2-8, 1969.
7. Cerisola JA, Chaben MF, Lazzari JO. Test de hemaglutinacion para el diagnostico de la enfermedad de Chagas. Prensa Medica Argentina 49:1761-1767, 1992.
8. Prata A, Mayrink W, Sodrê AG, Almeida JO. Discrepâncias entre resultados de reações de Guerreiro-Machado executadas em diferentes laboratórios. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 10:103-105, 1976.
9. Teixeira ARL. The stercorarian trypanosomes. In: Soulsby EJJ (ed) Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, CRC Press, Boca Raton, Florida p.25-118, 1987.
10. Teixeira ARL. Hipersensibilidade tardia a antígenos do *Trypanosoma cruzi*. I. Estudo experimental em coelhos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 28:249-257, 1995.
11. Teixeira ARL, Pereira LM. Discrepâncias entre resultados de três reações sorológicas empregadas para diagnóstico da doença de Chagas. Revista Brasileira de Biologia 41:789-795, 1981.
12. Teixeira ARL, Santos-Buch CA. The Immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. Immunology 28:401-410, 1974.
13. Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated <sup>51</sup>Cr release from human heart cells in Chagas' disease. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27:1097-1107, 1978.
14. Zeldon R, Ponce C. A skin test for the diagnosis of Chagas' disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 68:414-415, 1974.