

## AVALIAÇÃO DE REAGENTE LIOFILIZADO DE HEMAGLUTINAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO DA TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA. ESTUDO EM 1.123 SOROS DE DOADORES DE SANGUE

Mário E. CAMARGO (1), Sebastião Mariano BATISTA (2) e Sumie HOSHINO-SHIMIZU (2)

### RESUMO

Para a avaliação de reagente estável para o teste de hemaglutinação destinado ao diagnóstico sorológico da doença de Chagas (reagente "I.M.T. de Chagas-hemaglutinação"), fizeram-se estudos comparativos entre essa prova e a reação de Machado-Guerreiro, em 1.123 soros. As amostras, tomadas ao acaso entre doadores em bancos de sangue de várias regiões do País, foram submetidas a ambos os testes em dois laboratórios diferentes. Os resultados foram analisados quanto à concordância entre testes e entre laboratórios. Com referência aos resultados da hemaglutinação e da fixação do complemento, verificou-se concordância entre ambos os testes, de 99,4% e 98,5% respectivamente em cada laboratório. Não se observaram variações significativas entre grupos de soros provenientes de regiões diferentes. Quanto à reprodutibilidade dos resultados entre laboratórios, houve concordância de 99,2% para a reação de hemaglutinação e de 98,3% para a reação de fixação do complemento.

Os resultados indicam elevado grau de sensibilidade e de especificidade para o teste de hemaglutinação realizado com o reagente estável, bem como excelente reprodutibilidade do teste entre os laboratórios.

### INTRODUÇÃO

A aplicação de um mesmo teste sorológico a grupos populacionais diferentes por vezes é acompanhada de variações quanto à especificidade dos resultados. A ocorrência de fatores diversos pode condicionar o aparecimento de reações cruzadas e maior ou menor número de falsos resultados positivos<sup>1</sup>.

O teste de hemaglutinação para diagnóstico da doença de Chagas, feito com antígeno estável, preparado e liofilizado no Laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — reagente IMT de Chagas-hemaglutinação —, vem sendo avaliado por comparação com outros testes sorológicos.

Em estudo recente, realizado com o auxílio de vários laboratórios de investigação no Brasil<sup>2</sup>, tivemos oportunidade de verificar aparentes variações de especificidade, traduzidas por índices de co-negatividade para a reação de fixação do complemento, que oscilaram entre valores extremos de 0,9211 e 0,7188. Embora se devam levar em conta diferenças técnicas e de antígenos de fixação de complemento entre alguns desses laboratórios, não se pode excluir a possibilidade de ocorrência, em populações de diferentes áreas geográficas, de fatores diversos interferindo na especificidade do teste de hemaglutinação.

(1) Professor Assistente doutor, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

(2) Professor Assistente de Parasitologia, Mestre em Ciências, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e pesquisador do Centro de Pesquisas René Rachou de Belo Horizonte da Fundação Fiocruz.

Trabalho realizado com a colaboração da Johnson & Johnson S.A. Indústria e Comércio

Os altos índices de co-positividade, revelados pelo estudo referido<sup>6</sup>, mostraram a elevada sensibilidade do teste de hemaglutinação. Embora tal característica seja de importância fundamental para qualquer teste sorológico destinado à triagem de doadores infectados, em bancos de sangue, reações de baixa especificidade terão o grave inconveniente de levarem amostras de sangue não infectado a rejeição desnecessária.

Por outro lado, não se pode deixar de assinalar, como possíveis causas de resultados discrepantes de testes sorológicos, eventuais diferenças quanto a minúcias de técnica ou a critérios de leitura das reações, que embora mínimos na aparência, podem levar a resultados significativamente diferentes. Não é excepcional que determinados processos laboratoriais se mostrem excelentes apenas nas mãos de seus Autores. Assim, julgamos pertinente que os mesmos soros fossem ensaiados em outro laboratório, para se avaliar a reprodutibilidade da reação de hemaglutinação, quando executada por outros investigadores.

Através a prestimosa colaboração de médicos de bancos de sangue situados em diferentes cidades do País, obtivemos amostras de soros de doadores, tomados ao acaso. A presente publicação relata os resultados de estudo comparativo, nesse material, entre os testes de hemaglutinação (HA) e de fixação do complemento (FC). Ambos os testes foram realizados em alíquotas dos mesmos soros, em dois laboratórios diferentes, no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e no Departamento de Zoologia e Parasitologia do I.C.B., Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### Soros

Foram colhidos ao acaso de doadores em bancos de sangue situados nas cidades de Belém, Brasília, Fortaleza, Goiânia, Natal e Recife, no total de 1.132 amostras. Os soros, separados no local, foram imediatamente congelados e assim enviados por via aérea para o laboratório em São Paulo. Aí foram degelados, separadas alíquotas que, novamente

congeladas, foram enviadas por via aérea ao laboratório em Belo Horizonte. Neste, foram examinados 1.123 soros. Em ambos os laboratórios, as amostras foram inativadas e submetidas aos testes de fixação do complemento e de hemaglutinação, cujas leituras e registro de resultados se fizeram independentemente para cada teste.

##### Reação de hemaglutinação

O reagente hemaglutinante foi preparado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo com formas de cultura da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*<sup>11</sup> obtidas em meio líquido ("LIT")<sup>2</sup> após incubação a 28°C por 8 a 12 dias. Os parasitas, lavados em solução salina (NaCl 0,15M), foram centrifugados a 3.000 g por 10 minutos e o sedimento suspenso em solução de tioglicolato de sódio a 0,1% contendo mertiolato a 1:1.000, na proporção de 20 mg de sedimento úmido por mililitro de solução. A suspensão foi submetida a ultra-som, por alguns segundos, em banho de gelo, mantida a 4°C por cerca de 24 horas para extração, e centrifugada. O extrato antigênico representado pelo sobrenadante foi isotonicado pela adição de solução concentrada de NaCl. Para a sensibilização de hemácias humanas formolizadas, estas eram tratadas por ácido tânico e, em seguida, por extrato antigênico diluído em PBS (NaCl 0,15M; fosfatos 0,15M, pH 7,2) em concentração para máxima sensibilização. Esta se traduzia por títulos hemaglutinantes máximos para soros-padrão positivos e era obtida por diluições do extrato contendo 0,1 a 0,3 mg de proteínas por mililitro, dosadas pelo método de LOWRY & col.<sup>8</sup> contra padrão de globulinas humanas. As hemácias sensibilizadas foram tratadas, em seguida, por solução de glutaraldeído a 0,1% em PBS, por 30 minutos a 37°C, lavadas e suspensas em solução liofilizadora contendo proteínas e ácidos aminados como estabilizadores. O reagente liofilizado era reconstituído em água destilada, para uso. As reações se faziam em placas plásticas com cavidades em V (\*), como já descrito<sup>4</sup>, com soros diluídos a 1:30 em solução de NaCl a 0,85%.

#### Reação de fixação do complemento

No laboratório de São Paulo foram feitas, como descrito anteriormente<sup>5</sup>, em placas plásticas escavadas, com cavidades em U (\*), com antígeno segundo MAEKELT<sup>9</sup>. No laboratório de Belo Horizonte, a FC foi feita com antígeno e técnica segundo FREITAS & ALMEIDA<sup>7</sup>.

#### RESULTADOS

As porcentagens de positividade dos dois testes, para amostras das diversas regiões, variaram entre 0,5% e 9,5% (Quadro I).

Verificou-se estreita concordância entre os resultados dos testes de hemaglutinação e de fixação do complemento, em ambos os laboratórios (Quadros I e II). Essa concordância foi de 99,4% para o laboratório em São Paulo e de 98,5% para o laboratório em Belo Horizonte. A menor concordância pa-

ra este se deve a maior número de resultados inconclusivos na reação de fixação do complemento, por anticomplementaridade dos soros, certamente devida à maior manipulação sofrida pelas amostras. Dos soros com fixação do complemento positiva, todos tiveram hemaglutinação positiva, com exceção de apenas 1, com resultado duvidoso em um dos laboratórios. Os índices de co-negatividade do teste de hemaglutinação, com referência à fixação do complemento, foram muito elevados, de 0,9964 para os resultados de São Paulo e 0,9991 para os de Belo Horizonte. Não houve variações significativas entre índices de co-negatividade de grupos de soros correspondentes às diferentes regiões de origem das amostras (Quadro I).

Quanto à reprodutibilidade dos testes, verificou-se concordância de resultados de ambos os laboratórios em 99,2% das amostras, para a reação de hemaglutinação e em 98,3% para a reação de fixação do complemento.

#### QUADRO I

Procedência de 1.132 amostras de soro de doadores de sangue e resultados comparativos entre as reações de hemaglutinação (HA) e de fixação do complemento (FC), realizadas no laboratório em São Paulo, segundo as respectivas porcentagens de positividade e índices de co-negatividade HA/FC

Local	N.º de amostras	Porcentagens de positividade		Índices de co-negatividade HA/FC
		FC	HA	
Belém	199	0,5%	0,5%	1,000
Brasília	201	3,0%	3,5%	0,995
Fortaleza	200	1,0%	1,0%	1,000
Goiânia	126	7,9%	9,5%	0,983
Natal	200	1,0%	1,5%	0,995
Recife	206	1,5%	1,9%	0,995
Total	1.132	2,1%	2,6%	0,996

(\*) Cooke Engineering Co., U.S.A.

### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados indicam elevado grau de sensibilidade e de especificidade para o teste com o "reagente I.M.T. de Chagas-hemaglutinação", quando comparado com a reação de Machado-Guerreiro realizada com antígenos satisfatórios. Os altos índices de co-

gatividade são a expressão dessa especificidade, não se constatando a ocorrência de fatores regionais que pudessem ocasionar falsos resultados positivos. A reprodutibilidade do teste de hemaglutinação foi também muito alta, como indica a estreita concordância de resultados entre os dois laboratórios.

### QUADRO II

Resultados comparativos dos testes de hemaglutinação e de fixação do complemento, em dois laboratórios diversos, para o mesmo grupo de 1.123 amostras de soro

Reação de hemaglutinação	Reação de fixação do complemento							
	Laboratório em São Paulo				Laboratório em Belo Horizonte			
	Inconclusiva	Reagente	Não reagente	Total	Inconclusiva	Reagente	Não reagente	Total
Duvidosa	0	0	0	0	0	1	0	1
Reagente	1	24	4	29	4	21	1	26
Não reagente	2	0	1.092	1.094	11	0	1.085	1.096
Total	3	24	1.096	1.123	15	22	1.086	1.123

O teste de hemaglutinação é, sem dúvida, de execução mais simples que a reação de Machado-Guerreiro, desde que se disponha de reagente estável como aquele presentemente analisado. A incorporação de tampões e de proteínas estabilizadoras no próprio reagente permite diluir os soros em solução salina comum, de NaCl a 0,85%, dispensando-se diluentes mais complexos. Pelas características aqui evidenciadas, pode-se recomendar a utilização do "reagente I.M.T. de Chagas-hemaglutinação" para triagem, em bancos de sangue, de doadores infectados. Como frisado pelo Grupo de Estudos da Sorologia da Doença de Chagas, patrocinado pela Organização Panamericana da Saúde<sup>10</sup>, é de toda a conveniência não se firmar o diagnóstico sorológico em um único tipo de teste. A associação de pelo menos duas provas diferentes trará maior segurança aos resultados, não apenas pela complementação recíproca dos testes quanto à sensibilidade, mas ainda pela

possibilidade de confronto de resultados e detecção de eventuais falhas técnicas, como por nós encarecido em publicação anterior<sup>3</sup>.

### SUMMARY

*Evaluation of a stable, freeze-dried reagent for the American trypanosomiasis hemagglutination test. Study in 1,123 serum samples from blood donors*

In order to evaluate a stable, freeze-dried hemagglutination reagent for sero-diagnosis of Chagas' disease, prepared at the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, hemagglutination (HA) and complement fixation (CF) tests were compared in 1,123 serum samples. These were taken at random from blood donors in 5 different cities in Brazil (Belém, Brasília, Fortaleza, Goiânia, Natal and Recife), and both tests performed

independently in two laboratories, in São Paulo and Belo Horizonte. Results were analysed according to agreement between tests and between laboratories.

Agreement between test results was 99.4% in one laboratory and 98.5% in the other and no significant differences were observed for groups of samples collected in different cities. Reproducibility of test results between laboratories was 99.2% for HA and 98.3% for CF.

Results indicate the HA test performed with the preserved reagent as a sensitive, specific and reliable test.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível através a colaboração dos Drs. W. Dimenstein (Recife), M. J. F. Ferreira (Belém), R. Fujita (Fortaleza), R. G. Buenos e Freitas (Brasília), H. Ribeiro Neto (Goiânia), L. V. Medeiros Rocha (Natal), que forneceram as amostras de soro, sob a coordenação do Dr. F. Herynkopf. Agradecemos ainda a eficiente colaboração técnica das Srtas. Eufrosina S. Umezawa e Vera de Paula Quartier e ao técnico Raimundo Luiz Pinto, do Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUCK, A. A. & ANDERSON, R. I. — Validation on the complement fixation and slide flocculation test for schistosomiasis. Geographic variations of test capacities. *Amer. J. Trop. Epidemiol.* 96:205-214, 1972.
2. CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I — Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:93-100, 1964.
3. CAMARGO, M. E. — Reacciones serologicas y consecuencias sociales de los resultados positivos a la enfermedad de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panamer.* 72:576-582, 1972.
4. CAMARGO, M. E.; HOSHINO, S.; CORREA, N. S. & PERES, B. A. — Hemagglutination test for Chagas'disease with chromium chloride formalin-treated erythrocytes sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:45-50, 1971.
5. CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & UMEZAWA, E. S. — Further evaluation of the "I.M.T.-Chagas flocculation test". A comparison with complement fixation, hemagglutination and immunofluorescence tests. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17: 230-235, 1975.
6. CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & UMEZAWA, E. S. — Reagente de hemaglutinação liofilizado para o diagnóstico sorológico da tripanossomíase americana. Estudo conjunto em 8 laboratórios de investigação no Brasil (a ser publicado).
7. FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para a moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*. *Hospital (Rio)* 35: 787-800, 1949.
8. LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
9. MAEKELT, G. A. — Die Komplementbindungsreaktion der Chagaskrankheit. *Ztschr. Tropenmed. u. Parasit.* 11:152-186, 1960.
10. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION — Report on a study group on the serological diagnosis of Chagas'disease. San José, Costa Rica, 1970.
11. PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20:191-208, 1953.

Recebido para publicação em 9/1/1975.