

PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS EM BANCO DE SANGUE ATRAVÉS DA REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO E IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA. DISCREPÂNCIAS ENTRE AS REAÇÕES E POSSIBILIDADE DE FALHAS NA SELEÇÃO DE DOADORES*

Alice Mioko Nishimura Takaoka**
Lauro Takaoka** e
Mauro Célio de Almeida Marzochi***

Utilizando a Reação de Fixação de Complemento (FC) e Imunofluorescência Indireta (IF) os AA. encontraram no Banco de Sangue do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil, 7,4% de reações sorológicas positivas para doença de Chagas em 3.000 candidatos a doadores de sangue sendo concordantes em 97,1% e discordantes em 2,9%. A IF se mostrou mais sensível que a FC, sendo o risco de se encontrar um resultado positivo na IF quando esse era negativo ou duvidoso na FC estimado como sendo 15 vezes maior que o risco de se encontrar um resultado positivo na FC quando esse era negativo ou duvidoso na IF. A segurança das provas sorológicas aumentam quando se consideram os resultados duvidosos ou anticomplementares como positivos.

Em outro grupo de candidatos a doador que já haviam doado sangue anteriormente, 450 tinham de uma a seis reações de FC prévias feitas em outro laboratório. Desses encontraram-se 10 indivíduos (2,2%) com reação positiva ou duvidosa em pelo menos uma oportunidade, o que mostra a relatividade da seleção de doadores apenas pela reação sorológica, discute-se a utilização alternativa da violeta de genciana pelos serviços de hemoterapia.

INTRODUÇÃO

Após Pedreira de Freias & col.¹⁴ que em 1952 comprovaram parasitologicamente a transmissão pós transfusional da doença de Chagas, muitos pesquisadores têm se preocupado com a prevenção desta moléstia em Bancos de Sangue, principalmente pela crescente utilização e importância dada à hemoterapia. Apesar do número de casos publicados ser pequeno (cerca de 48 casos) e muitas vezes descobertos acidentalmente em laboratórios^{7, 8} admite-se que o problema seja grave, principalmente se consideradas as evidências de falha na seleção de doadores através de reações sorológicas. Jatene & Jacomo¹⁵ realizaram em doadores de sangue a reação de fixação de complemento (FC) duas vezes, com amostras diferentes; encon-

trando 4,98% de resultados discrepantes. Campos & col.⁹ em um trabalho similar, demonstraram 5,53% de resultados discordantes. Rassi & col.¹⁸ evidenciaram a existência de flutuações nos resultados sorológicos durante a evolução da moléstia com períodos de negatização da FC. Salgado & col.¹⁹ verificaram que o mesmo paciente pode apresentar no mesmo dia xenodiagnóstico positivo e FC negativa, tanto com antígeno metílico como benzeno-cloroformado. Amato Neto & col.¹ e Cerisola & col.¹¹ demonstraram a alta incidência da D. Chagas em indivíduos politransfundidos, mesmo em serviços onde há seleção sistemática de doadores. Prata & col.¹⁷ responsabilizaram a falta de padronização das reações sorológicas pelos resultados discrepantes fornecidos por três laboratórios diferentes com as mesmas

* Trabalho realizado no Setor de Imunologia do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

** Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

*** Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

amostras. Camargo⁸ lembra a necessidade de melhorar a qualidade dos antígenos e a implantação de laboratório de referência. Por outro lado, tem-se aventado a possibilidade de variações antigênicas do *T. cruzi*, durante a parasitemia^{16, 18}, que tenderia a diminuir ainda mais a eficácia da prevenção da transmissão da doença de Chagas por transfusão sanguínea, através de reações sorológicas.

Baldy & col³ notificaram em 1976 os primeiros casos da doença de Chagas pós-transfusional no Estado do Paraná. Desde então adotamos em nosso laboratório a realização simultânea das provas de FC e de imunofluorescência indireta (IF) para a doença de Chagas com a finalidade de aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

O objetivo do presente trabalho é apresentar a atual prevalência da doença de Chagas no Banco de Sangue do Hospital Universitário de Londrina e as discrepâncias observadas nos resultados das reações de FC e IF realizados simultaneamente, assim como, discutir a possibilidade de erro na seleção de doadores de sangue.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizaram-se simultaneamente a FC e a IF para doença de Chagas em 3.000 candidatos a doador de sangue do Banco de Sangue do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina, no período de outubro de 1976 a março de 1977. Tratava-se de familiares ou pessoas de relacionamento de doentes internados, provenientes em sua maioria da zona rural, e de voluntários surgidos espontaneamente ou quando convocados publicamente, invariavelmente moradores da zona urbana. Dentre os voluntários, 450 já haviam doado sangue anteriormente com a frequência de uma a seis doações e com apenas provas de FC realizadas em laboratório particular da Cidade de Londrina.

As provas sorológicas foram realizadas no Setor de Imunologia do Laboratório Clínico do Hospital Universitário, utilizando-se antígeno metílico e benzenocloroformado (Lio Serum) para FC quantitativa, segundo Freitas & Almeida¹³. A IF foi realizada segundo técnica descrita por Camargo⁶, empregando-se antígenos e conjugados procedentes do Instituto Pasteur. Os resultados foram referi-

dos como positivo, negativo e duvidoso ou anticomplementar para FC e de positivo, negativo e duvidoso para a IF, segundo critérios preconizados por vários Autores^{6, 13}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois testes (FC e IF) em conjunto, aplicados a todos os doadores de sangue, como mostra o Quadro I, evidenciaram uma proporção de positivos de 7,4% (221 em 3.000 examinados), equivalente ao encontrado por outros Autores^{4, 5, 12}. Esse número é justificado pelo afluxo à região de grande número de trabalhadores de baixa qualificação profissional migrados principalmente do Nordeste e Região Centro-Sul do País, onde têm sido descritos altos índices de positividade para doença de Chagas.

Considerando-se os dois testes em separado, verificamos uma positividade para FC de 5,4% e para IF de 7,2%. A positividade da IF, portanto, foi quase igual à dos dois testes juntos.

Comparando-se os resultados dos dois exames, vemos que houve concordância em 2.912 (97,1%) e discordância em 88 (2,9%) dos soros. A discordância entre os dois testes, quando analisada considerando as categorias *positivo*, *duvidoso* e *negativo*, foi significativa a um nível de significância de 0,05 (Quadro II).

Categorizando os resultados apenas em *positivos* e *não positivos* (incluindo nessa última categoria negativos e duvidosos) temos 2,1% de resultados discordantes e 97,9% de concordantes (Quadro III). A variação dos

QUADRO I

Resultados em conjunto das reações de fixação de complemento (FC) e de imunofluorescência indireta (IF) em 3.000 doadores de sangue do Hospital Universitário de Londrina, Paraná

Resultados	Nº de casos	%
Positivo	221	7,33
Duvidoso	35	1,16
Negativo	2744	91,47
Total	3000	100,0

QUADRO II

Resultados das reações de fixação de complemento (FC) e de imunofluorescência indireta (IF) concordantes e discordantes em relação aos positivos, duvidosos ou negativos em 3000 doadores de sangue do Hospital Universitário de Londrina, Paraná

FC \ IF	IF			Total
	Positivo	Duvidoso	Negativo	
Positivo	157	13	1	161
Duvidoso	47	16	11	74
Negativo	13	13	2739	2765
Total	217	32	2751	3000

Concordantes: 2912 (97,1%)

Discordantes: 88 (2,9%)

QUADRO III

Resultados das reações de fixação de complemento (FC) e de imunofluorescência indireta (IF) concordantes e discordantes em relação a positivos e não positivos em 3000 doadores de sangue do Hospital Universitário de Londrina, Paraná

FC \ IF	IF		TOTAL
	POSITIVOS	NÃO POSITIVOS	
POSITIVOS	157	4	161
NÃO POSITIVOS	60	2779	2839
TOTAL	217	2783	3000

Concordantes: 2936 (97,9%)

Discordantes: 64 (2,1%)

resultados é novamente significativa sendo que 7,2% foram dados como positivos pela IF e 5,4% pela FC, pouco alterando os resultados encontrados na tabela com as três categorias (Quadro II). O risco de ocorrer um resultado positivo à FC quando era negativo ou duvidoso pela IF foi estimado como sendo 15 vezes menor que o risco de se encontrar um resultado positivo à IF quando esse era negativo ou duvidoso à FC.

Considerando, portanto, os resultados como *positivos* ou *não positivos*, a IF dá uma maior proporção de positivos que a FC e uma proporção praticamente igual àquela

obtida com as duas reações realizadas simultaneamente.

Se agrupamos os resultados *duvidosos* com os *positivos* de modo a diminuir os riscos de um falso negativo, aumentando a sensibilidade do exame, como é habitual nos exames de "screening", teremos com a IF 8,3% de amostras *incriminadas* como positivas ou suspeitas e com a FC 7,8% (Quadro IV). Encontramos dessa maneira 1,3% de discordância e 98,7% de resultados concordantes. Estatisticamente não observamos diferença significativa ao nível estabelecido de 0,05 e, portanto, não podemos afirmar haver

QUADRO IV

Resultados das reações de fixação de complemento (FC) e de imunofluorescência indireta (IF) concordantes e discordantes em relação a positivo ou duvidoso e negativo em 3000 doadores de sangue do Hospital Universitário de Londrina, Paraná

FC \ IF	Positivo ou Duvidoso	Negativo	Total
Positivo ou duvidoso	233	12	235
Negativo	26	2739	2765
Total	249	2751	3000

Concordantes: 2962 (98,7%)

Discordantes: 38 (1,3%)

diferença na proporção de resultados incriminados como *positivos* ou *duvidosos* pelos dois exames. Poderíamos, assim, utilizar qualquer dos dois testes se considerássemos os resultados *duvidosos* iguais aos *positivos*.

Notemos ainda que uma parte importante dos resultados *duvidosos* à FC foram na verdade anticomplementares, o que aumentou o percentual dos duvidosos com essa técnica e que, quando agrupados em uma mesma categoria *positivos* e *duvidosos*, aumentou-se a sensibilidade do exame e portanto a capacidade de se descartar os sangues capazes de veicular o *Trypanosoma cruzi* e diminuiu-se a especificidade de um modo não quantificado. Isso pode levar a se desprezar uma proporção de amostras desnecessariamente, principalmente quando a prevalência de verdadeiros positivos for baixa, o que tornaria elevada a razão entre falsos positivos e verdadeiros positivos.

Devido, entretanto, ao risco de transmissão e à gravidade da infecção cremos ser melhor trabalhar com um teste de maior sensibilidade como a IF, confirmando os achados de Araujo & Batista².

Por outro lado, 450 doadores que já haviam doado sangue anteriormente com reações repetidas uma ou mais vezes pela FC, em amostras de sangue obtidas em datas diferentes, tiveram resultados negativos concordantes em 440 casos (97,8%) e discordantes em 10 casos (2,2%), que apresentaram reação positiva ou duvidosa em pelo menos

uma oportunidade (Quadro V). Desses, 295 indivíduos tiveram as FC repetidas por duas vezes, 120 indivíduos por três vezes, nove indivíduos por quatro vezes, dois indivíduos por cinco vezes e quatro indivíduos por seis vezes. Em nenhum dos casos em que inicialmente a reação era negativa houve possibilidade de adquirir a infecção no intervalo entre as reações discrepantes.

O encontro de 2,2% de resultados positivos ou duvidosos entre reações efetuadas em doadores tidos como negativos em épocas e

QUADRO V

Resultados das reações de fixação de complemento (FC) e de imunofluorescência indireta (IF) concordantes e discordantes em 450 doadores que possuíam de 2 a 6 reações sorológicas (FC) prévias no período de novembro de 1972 e março de 1977

Resultados	Nº de casos	%
Concordantes (*)	440	97,8
Discordantes (**)	10	2,2
Total	450	100,0

(*) Sempre negativos

(**) Com pelo menos uma reação positiva, duvidosa ou anticomplementares

amostras diferentes é de grande importância porque os pacientes submetidos a transfusão de sangue correm grande risco de adquirir a infecção. Semelhantemente ao que já havia sido observado⁴, dentre os 221 indivíduos com sorologia positiva, dos 3.000 doadores, cerca de 25,0% referem ter doado sangue anteriormente em outros hospitais sendo que 18,0% em período inferior a um ano e 11,0% nos seis meses antecedentes ao exame.

Tendo em vista dificuldades de ordem técnica e econômica na realização de provas sorológicas para triagem de doadores de sangue e das múltiplas causas de erro a que a utilização sistemática de violeta de genciana (ou outras drogas com as mesmas características), pela sua inocuidade, deve ser não só enfatizada, como adotada alternativamente por todos os serviços de hemoterapia do País.

SUMMARY

The complement fixation reaction (CF) and indirect immunofluorescence (IF) were used to test serum from 3,000 potential blood donors at the Blood Bank of the University Hospital, Londrina, Paraná State, Brazil. A total of 7.4% of positive serological reactions was the results of the two tests being concordant in 97.1% and discordant in 2.9%. The IF test was more sensitive than CF; positive results by IF with negative or doubtful results by CF were 15 times more frequent than positive results by CF with negative or doubtful results by IF. Judging by the results of the two tests, the security of selection of acceptable blood samples was greater when doubtful results or anti complementary sera were considered positive.

In another group of volunteer candidates for blood donation who had donated blood on other occasions, 450 had had one to six CF tests carried out in other laboratory. Of these, 10 (2.2%) had had doubtful or positive reactions in one or more of these previous tests but had been accepted as potential donors at the time of the present study. These results demonstrate the relative nature of the process of donor selection on the basis of serological reactions. The alternative utilization of gencian violet by hemotherapy services is discussed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; MOLINARI, H.E.; SIQUEIRA, A.F. & LUCAS, R.S. — Análise, por meio de fixação do complemento, do risco de aquisição da doença de Chagas através de hemoterapia, por parte de pacientes politransfundidos. *Rev. Goiana Med.* 21:1-9, 1975.
2. ARAUJO, F.C. & BATISTA, S.M. — Observações sobre os testes de fixação de complemento e imunofluorescência indireta em Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11:104-110, 1969.
3. BALDY, J.L.S.; TAKAOKA, L.; PASSOS, J.N.; MOCELIN, A.J.; CHIEFFI, P.P. & GOMES, A.C. — Doença de Chagas pós-transfusional: apresentação de três casos. Apresentado ao XII Congresso de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém, 1976.
4. BALDY, J.L.S.; TAKAOKA, L.; PEREIRA, J.D.; CALIXTO, A.A. & DUARTE, E.F. — Prevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi*, em 1975, em dois bancos de sangue de Londrina, Paraná, Brasil. *Rev. Saúde Publ., São Paulo*. 12::409-416, 1978.
5. BROFMAN, S. — Incidência da doença de Chagas no Norte do Paraná. *Arq. Bras. Cardiol.* 11:209-210, 1958.
6. CAMARGO, M.E. — Fluorescent Antibody teste for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 8:227-234, 1966.
7. CAMARGO, M.E. & LESER, P.G. — Diagnóstico acidental de laboratório de infecções chagásicas agudas pós-transfusionais, não suspeitadas. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* 20:335-336, 1974.
8. CAMARGO, M.E. — Identificações no laboratório clínico de doença de Chagas pós transfusional não suspeitada. *Rev. Bras. Pat. Clin.* 12:201-203, 1976.

9. CAMPOS, C.; RESENDE, J.M. & RASSI, A. — Prevalência da doença de Chagas no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Goiânia. Possibilidade de falha da reação de Guerreiro-Machado na seleção de doadores. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 9:165-174, 1975.
10. CERISOLA, J.A.; ALVAREZ, M & WEGNER, D. — A comparison of a new antigen from amastigotes of *T. cruzi* and an antigen from epimastigotes for the diagnosis of Chagas disease by the immunofluorescent test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 13:162-166, 1971.
11. CERISOLA, J.A.; RABINOVICH, A.; ALVAREZ, M.; Di CORLETO, C.A. & PRUNEDA, J. — Enfermedad de Chagas y la transfusion de sangre. *Bol. Of. Sanit. Panamer.* 63:203-221, 1972.
12. COTARELLI, D.A.; BLANCO, D.H.; SILVA, F.C. & ELLAKKIS, F. — Dados sobre o estado atual da "Doença de Chagas" em Londrina. *Rev. Pat. Trop.* 4:421-429, 1972.
13. FREITAS, J.L.P. & ALMEIDA, J.O. de — Nova técnica de F.C. para moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *T. cruzi*. *Hospital (Rio)* 35:787-800, 1949.
14. FREITAS, J.L.P.; BIANCALANA, A.; AMATO NETO, V.; NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R. & BARRETO, J.G. — Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas no homem por transfusão de sangue. *Rev. Paulista Med.* 40:36-40, 1952.
15. JATENE, A.D. & JACOMO, R. — Doença de Chagas e transfusão de sangue. *Rev. Goiana Med.* 5:23-30, 1959.
16. MAGNANNI, M.A.C.; FERRIOLLI FILHO, & SIQUEIRA, A.F. — Imunoglobulinas específicas (Ig A, Ig G e Ig M) em soros de chagásicos crônicos verificados por reações de imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 15:72-75, 1973.
17. PRATA, A.; MAYRINK, W.; SODRÉ, A.G. & ALMEIDA, J.O. — Discrepâncias relativas entre resultados de reação de Guerreiro-Machado, executados em três diferentes laboratórios. *Rev. Pat. Trop.* 4:35-38, 1975.
18. RASSI, A.; AMATO NETO, V. & SIQUEIRA, A.F. — Comportamento evolutivo da reação de fixação do complemento na fase crônica da moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 11:430-435, 1969.
19. SALGADO, A.A.; MAYRINK, W.E. & DIAS, J.C.P. — Estudo comparativo entre a reação de fixação do complemento com Ag. benzeno cloroformado e metílico e o xenodiagnóstico. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 72:36-40, 1970.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Chagastelles Sabroza, do Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos da Escola Nacional de Saúde Pública — FIOCRUZ, pelo estudo estatístico realizado.