

## AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS DO TRYPANOSOMA CRUZI PARA A REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA. I. DIFERENTES EXTRATOS ANTIGÊNICOS

Ricardo Wagner de Almeida VITOR & Egler CHIARI

### RESUMO

Alguns procedimentos descritos na literatura (ultrassom, água destilada, NaOH, TRITON x 100 e congelamento-descongelamento) foram avaliados determinando o melhor extrato antigênico para a reação de hemaglutinação indireta (RHI) no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Para isso, foram ensaiados 30 soros de indivíduos chagásicos e 30 soros de indivíduos não chagásicos. A reação de imunofluorescência indireta foi considerada como reação de referência no cálculo dos índices de co-positividade (i.c.p.) e co-negatividade (i.c.n.). O valor do i.c.p. para a RHI com antígeno obtido por NaOH foi mais elevado do que para os outros antígenos. Os cinco antígenos apresentaram valores máximos para o i.c.n., indicando boa especificidade. Os títulos apresentados pelos soros chagásicos com antígeno obtido por NaOH foram, significativamente, superiores aos demais antígenos.

A avaliação de cinco partidas de antígeno extraídas por NaOH em épocas diversas indicam boa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade de resultados, traduzidas pelos valores elevados para os i.c.p. e i.c.n., além de títulos próximos entre si.

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

### INTRODUÇÃO

Apesar da utilização de várias reações sorológicas como a Imunofluorescência indireta (RIFI), Fixação de Complemento (RFC) e Aglutinação direta no diagnóstico da doença de Chagas, a reação de hemaglutinação indireta (RHI) é, sem dúvida, a mais indicada na rotina laboratorial, principalmente devido à facilidade de execução, custo reduzido e rapidez de leitura.

Vários são os estudos para padronização de metodologia e antígenos utilizados na RHI. Têm sido utilizados antígenos extraídos por tratamento de epimastigotas por vibração ultrasônica<sup>12</sup>, por água destilada<sup>7</sup>, por congelamento-descongelamento<sup>9</sup>, por desoxicolato de sódio<sup>5</sup>, por hidróxido de sódio<sup>8</sup> e por TRITON x 100<sup>11</sup>. Em consequência deste número variado de processos extratores, a RHI tem apresentado com-

portamento variado, traduzido pelas diferenças na sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da reação.

Neste trabalho estão descritos os resultados da RHI utilizando antígenos extraídos por diferentes processos já descritos na literatura com intuito de selecionar aquele capaz de fornecer melhor sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade após comparação com os mesmos soros.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Amostras de soros

Foram utilizadas 60 amostras de soros de indivíduos do Estado de Minas Gerais, sendo

30 de pacientes chagásicos de Bambuí, reagentes pela RIFI e 30 soros de indivíduos aparentemente normais, de Ribeirão das Neves. As amostras de soro foram divididas em alíquotas e conservadas à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

#### Reação de Hemaglutinação Indireta

Os reagentes hemaglutinantes foram preparados utilizando cinco diferentes extratos de epimastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* cultivadas em meio líquido ("LIT"). Os flagelados foram lavados por três vezes à frio em solução NaCl 0,15 M por centrifugação à 1000 g por 15 minutos e, a seguir, liofilizados. A extração por ondas ultrasônicas foi realizada após delipidação do material com benzeno e sonicação em banho de gelo durante três tempos de um minuto a 40 hertz, com intervalos de um minuto. Os outros extratos foram obtidos por tratamento de epimastigotas com água destilada<sup>7</sup>, com NaOH à 0,15 M<sup>8</sup>, com TRITON x 100<sup>11</sup> e por seis processos sucessivos de congelamento e descongelamento<sup>9</sup>. Após cada extração, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante final (extrato antigênico) foi estocado em alíquotas à  $-20^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteínas foi determinada pelo método de LOWRY e col.<sup>10</sup> contra padrão de albumina de soro bovino.

Eritrócitos formalizados foram tratados pelo extrato antigênico conforme metodologia descrita por HOSHINO-SHIMIZU e col.<sup>8</sup> utilizando a concentração mínima ideal de proteína para máxima sensibilização. Após a sensibilização, os eritrócitos foram lavados por três vezes com solução NaCl 0,15 m e ressuspensos à 2% em solução preservadora<sup>8</sup> diluída três vezes em água destilada. As reações foram realizadas em placas plásticas com cavidade em V, como descrito por CAMARGO e col.<sup>6</sup>. Os soros foram diluídos a partir de 1:20 em PBS pH 7.2.

#### Reação de Imunofluorescência Indireta

Foi executada de acordo com CAMARGO<sup>4</sup>, sendo utilizada como reação de referência na determinação de anticorpos circulantes anti-T. cruzi no cálculo dos índices de co-positividade, co-negatividade e concordância<sup>3</sup>.

#### 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 ARMITAGE<sup>1</sup>.

### RESULTADOS

O rendimento protéico, traduzido pela concentração final de proteína no extrato antigênico, mostra diferenças marcantes para os cinco diferentes métodos extratores. Os extratos obtidos por água destilada, TRITON x 100 e NaOH alcançaram rendimentos que ultrapassaram a faixa de 30%, sendo que este último alcançou rendimento máximo de 45%. Os outros dois extratos apresentaram rendimento inferior a 16%. A titulação em bloco também mostrou variação na concentração mínima ideal para sensibilizar os eritrócitos: extrato por NaOH, 15 microgramas; por ultra-som, 30 microgramas; por TRITON x 100, 60 microgramas e por água destilada e congelamento descongelamento, 125 microgramas de proteína por mililitro.

A tabela I apresenta a distribuição dos títulos obtidos para os 60 soros estudados. Os 30 soros de indivíduos chagásicos apresentaram títulos que oscilaram entre 20 e 160, com exceção do antígeno extraído por NaOH, cujos títulos variaram entre 40 e 640. Em relação aos soros de indivíduos não chagásicos, nenhum soro reagiu pela RHI na diluição de 1:20, exceto quando foi utilizado antígeno extraído por NaOH, quando foram observados 17 soros reagentes nesta diluição. Em consequência, utilizamos a diluição de 1:20 como título discriminante entre resultados positivos e negativos pela RHI para cálculo dos índices de co-positividade, co-negatividade e concordância, exceto quando os eritrócitos foram sensibilizados com antígeno extraído por NaOH, quando o título discriminante foi de 1:40.

Foram calculados os índices de co-positividade (i.c.p.), co-negatividade (i.c.n.) e concordância (i.c.) para a RHI com os diferentes extratos antigênicos tomando-se a RIFI como reação de referência. Os valores para o i.c.p. foram de 0,8667; 0,9667; 1,0000; 0,9667 e 0,9000 para

T A B E L A I

Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos pela reação de hemaglutinação indireta em 60 soros, utilizando antígenos obtidos por diferentes métodos de extração

Método de Extração	RIFI (Reação de Referência)	Recíproca de Títulos pela RHI								Total	MGRT*
		<20	20	40	80	160	320	640	1280		
Ultra-som	Positiva	4	11	10	5	—	—	—	—	30	29
	Negativa	30	—	—	—	—	—	—	—	30	
Água destilada	Positiva	1	5	12	10	2	—	—	—	30	47
	Negativa	30	—	—	—	—	—	—	—	30	
NaOH 0,15 M	Positiva	—	—	2	7	9	11	1	—	30	166+
	Negativa	13	17	—	—	—	—	—	—	30	
TRITON x 100	Positiva	1	7	7	12	3	—	—	—	30	49
	Negativa	30	—	—	—	—	—	—	—	30	
Congelamento e Descongelação	Positiva	3	2	11	8	6	—	—	—	30	45
	Negativa	30	—	—	—	—	—	—	—	30	

\* Média geométrica da recíproca dos títulos positivos

+ MGRT significativamente maior que as outras médias (F = 34,7; P < 0,05; DMS = 0,13)

os antígenos extraídos por ultra-som, água destilada, NaOH, TRITON x 100 e congelamento-descongelamento, respectivamente. Os valores para o i.c. foram respectivamente de 93,33%, 98,33%, 100,00%, 98,33% e 95,00%. Todos os antígenos apresentaram i.c.n. igual a 1,0000.

Foram ainda testadas cinco partidas de reagentes para a RHI com antígenos preparados utilizando extratos antigênicos obtidos por

NaOH, em épocas diversas. A tabela II mostra a distribuição dos títulos obtidos para os 60 soros estudados. Os valores obtidos no cálculo de i.c.p., i.c.n. e i.c. foram máximos para três partidas de antígeno. A partida de número 4 apresentou um resultado falso negativo, i.c.p. igual à 0,9667 e i.c. igual a 98,33%. A partida de número 5 apresentou dois resultados falso positivos, i.c.n. igual a 0,9333 e i.c. igual a 96,67%.

T A B E L A II

Distribuição da frequência dos títulos de anticorpos pela reação de hemaglutinação indireta em 60 soros, para cinco partidas de antígeno extraídas por NaOH 0,15 M em diferentes épocas

Partida de Antígeno	RIFI (Reação de Referência)	Recíproca de títulos pela RHI								Total	MGRT*
		<20	20	40	80	160	320	640	1280		
1a.	Positiva	—	—	2	7	11	7	3	—	30	166
	Negativa	22	8	—	—	—	—	—	—	30	
2a.	Positiva	—	—	2	7	12	7	2	—	30	160
	Negativa	19	11	—	—	—	—	—	—	30	
3a.	Positiva	—	—	2	7	9	11	1	—	30	166
	Negativa	13	17	—	—	—	—	—	—	30	
4a.	Positiva	—	1	7	6	12	4	—	—	30	102+
	Negativa	25	5	—	—	—	—	—	—	30	
5a.	Positiva	—	—	5	9	9	6	1	—	30	123
	Negativa	15	13	2	—	—	—	—	—	30	

\* MGRT — Média geométrica da recíproca de Títulos

+ MGRT significativamente menor que as outras médias (F = 2,80; p < 0,05; DMS = 0,16)

## DISCUSSÃO

O extrato antigênico obtido por NaOH apresentou o maior rendimento na extração de proteínas. Considerando que as formas de cultura contêm cerca de 43 a 53% de proteína por pe-

so<sup>14</sup>, podemos afirmar que o tratamento com NaOH extraiu praticamente todas as proteínas de epimastigotas. Deste extrato também foi exigido a menor concentração de proteínas para sensibilizar os eritrócitos, o que significa economia de material e tempo no preparo de um

número elevado de partidas de antígeno para a RHI.

Os maiores títulos pela RHI foram observados com antígeno extraído por NaOH, enquanto os outros quatro antígenos apresentaram, em geral, títulos baixos para os soros reagentes pela RIFI. Na maioria das descrições originais dos métodos de extração de antígeno para a RHI, os autores não tinham interesse maior em observar títulos ou calcular índices para avaliação dos métodos. A comparação dos nossos resultados com as descrições nos trabalhos iniciais fica, portanto, dificultada. Entretanto são possíveis algumas comparações, com resultados descritos posteriormente à descrição inicial das técnicas.

Deste modo, podemos observar que os títulos obtidos por CAMARGO e col.<sup>6</sup>, utilizando antígeno extraído por ultra-som, variaram entre 1:40 e 1:10.240, enquanto nossos resultados indicam títulos entre 1:20 e 1:80. Um estudo comparativo realizado pelos mesmos autores mostrou resultados semelhantes entre a RHI e as reações de referência (RIFI e RFC). De forma semelhante a RHI, com antígeno obtido por BATISTA<sup>2</sup>, segundo metodologia descrita por CERISOLA e col.<sup>7</sup>, através do tratamento de epimastigotas por água destilada, apresentou títulos variando entre 1:20 e 1:10.240 e sensibilidade igual a RFC. Os baixos títulos por nós observados contrastam com as referências na literatura que assinalam títulos elevados utilizando a RHI com antígenos semelhantes a estes, provavelmente por se tratarem de experimentos em que os autores utilizaram antígenos ricos em proteínas inespecíficas, o que favoreceria a ocorrência de reações inespecíficas.

Em relação ao extrato antigênico obtido por tratamento com NaOH, TAKEI e col.<sup>13</sup>, relatam a avaliação do antígeno descrito por HOSHINO-SHIMIZU e col.<sup>8</sup> durante um período de seis anos em comparação com a RFC, RIFI e reação de Floculação, observando que a RHI, com este antígeno alcalino, apresentou valor 99,0% para o índice de co-positividade e 99,2% para o índice de co-negatividade. Estes autores ainda relatam algumas vantagens da RHI utilizando este antígeno: estabilidade, economia de reagentes e reprodutibilidade, características também observadas por nós.

Os parâmetros ideais para avaliação de um teste soroiológico são a sensibilidade e especificidade, os quais podem ser estabelecidos quando o método diagnóstico de referência é o diagnóstico verdadeiro da infecção. Entretanto, este não é o caso da doença de Chagas devido à ocorrência de indivíduos falso-negativos, tanto pelo xenodiagnóstico, hemocultura ou por outros métodos de demonstração direta do *T. cruzi*. De acordo com BUCK & GART<sup>3</sup>, quando a reação de referência é o diagnóstico verdadeiro o índice de co-positividade é idêntico à sensibilidade e o índice de co-negatividade à especificidade. Considerando que a RIFI (reação de referência) apresenta sensibilidade e especificidade satisfatórias no diagnóstico da doença de Chagas, sendo capaz de identificar quase todos os casos verdadeiramente positivos e negativos, podemos afirmar, para melhor compreensão dos resultados obtidos, que os índices de co-positividade e co-negatividade, calculados em relação à RIFI, são sinônimos de sensibilidade e especificidade e serão denominados neste trabalho como sensibilidade relativa e especificidade relativa, isto é, sensibilidade e especificidade em relação à RIFI.

Os resultados descritos indicam diferenças na sensibilidade relativa da RHI utilizando antígenos do *T. cruzi* extraídos por diferentes métodos. O antígeno extraído por NaOH apresentou maior sensibilidade relativa e 100% de resultados concordantes com a RIFI. Todos os antígenos apresentaram valores máximos para i.c.n., indicando boa especificidade relativa.

Os resultados descritos também indicam uma boa reprodutibilidade dos reagentes preparados com cinco partidas diferentes de antígeno extraído por NaOH. Os títulos observados foram semelhantes, com exceção de uma partida com títulos ligeiramente inferiores (partida de n.º 4). Os índices de co-positividade, co-negatividade e concordância foram satisfatórios para todas as partidas de antígeno e, em sua maioria, apresentaram valores máximos, indicando boa sensibilidade e especificidade relativa.

Os resultados obtidos indicam o antígeno extraído por NaOH, descrito por HOSHINO-SHIMIZU e col.<sup>8</sup>, como o mais sensível e específico, sendo portanto o mais indicado para o uso, tanto na rotina de laboratório como na seleção de doadores em bancos de sangue e em levantamentos epidemiológicos.

## SUMMARY

### Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination test. I. Different antigenic extracts

To improve the sensitivity and specificity of the indirect hemagglutination test (IHA) for the serodiagnosis of Chagas' disease some previously described procedures (sonication, distilled water, NaOH, TRITON x 100, freezing and thawing) were tested to determine the most useful antigenic extract. Sera of 30 individuals with chronic Chagas' disease, demonstrated by immunofluorescence test, and sera of 30 non chagasic individuals were assayed. The immunofluorescence test (IFT) was the reference test to evaluate the co-positivity index and co-negativity index. Co-positivity results were better when the NaOH antigen was used. All antigens gave maximum values for co-negativity in relation to IFT. Titers presented by sera from chagasics tested by IHA with NaOH antigen were higher than those of the other four antigens.

Moreover, reliability of IHA with NaOH antigen was indicated by the sensitivity, specificity and reproducibility observed with five different reagent batches prepared with antigens extracted on different days.

## AGRADECIMENTOS

A Cléa de Andrade Chiari, pela ajuda na realização do presente trabalho; ao Evaldo Nascimento, pela dosagem de proteínas; ao Paul Williams pela revisão do resumo em inglês e aos laboratoristas Orlando Carlos Magno e Afonso da Costa Viana, pela ajuda técnica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMITAGE, P. — Statistical methods in medical research. 4th ed. London, Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 217-232.
2. BATISTA, S. M. — Teste de hemaglutinação com diferentes antígenos no diagnóstico da doença de Chagas. Belo Horizonte, 1973. (Tese — Universidade Federal de Minas Gerais).
3. 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.
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. 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. S. Paulo, 13: 45-50, 1971.
6. CAMARGO, M. E.; HOSHINO, S. & SIQUEIRA, G. R. V. — Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 15: 81-85, 1973.
7. CERISOLA, J. A.; CHABEN, M. F. & LAZZARI, J. O. — Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Pren. med. argent., 49: 1761-1767, 1962.
8. HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. E. & NAGASSE, 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.
9. KNIERIM, F. & SAAVEDRA, P. — Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de las parasitosis. Bol. chil. Parasit., 21: 39-44, 1966.
10. 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.
11. PIRAS, M. M.; RODRIGUEZ, O. O. & PIRAS, R. — *Trypanosoma cruzi*: Antigenic composition of axonemes and flagellar membranes of epimastigotes cultured in vitro. Exp. Parasit., 51: 59-73, 1981.
12. ROMAÑA, C. — Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico de la enfermedad de Chagas y de la toxoplasmosis. Orientación Med., 10: 560-564, 1961.
13. TAKEI, K.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K. & CAMARGO, M. E. — Evaluation of alkaline — solubilized *T. cruzi* epimastigotes antigens used in the hemagglutination test for the diagnosis of Chagas' disease. In: REUNIÃO ANUAL SOBRE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 12a., Ca-xambú, Minas Gerais, Brasil, 1985. Resumos. p. IM 20.
14. VON BRAND, T.; McMAHON, P.; TOBLE, E. J.; THOMPSON, M. J. & MOSETTIG, E. — Chemical composition of the culture form of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasit., 8: 171-181, 1959.

Recebido para publicação em 27/11/86