

## ASPECTOS DA PADRONIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA A DOENÇA DE CHAGAS: UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA A TRIAGEM DE DOADORES DE SANGUE

A. Walter FERREIRA (1, 2), Zila R. BELEM (2), M. Emília G. MOURA (2) & M. E. CAMARGO (1, 2)

### RESUMO

No diagnóstico sorológico da doença de Chagas podem ser encontradas acentuadas divergências mesmo entre laboratórios de grande experiência.

Para a padronização de um teste imunoenzimático destinado primariamente à seleção de doadores de sangue foram cuidadosamente escolhidos painéis de soros que se buscaram como representativos das populações de chagásicos e de não chagásicos. Produzido para máxima sensibilidade e estabilidade, o novo reagente (bioE-LISA - cruzi\*) foi testado em 1648 soros, com diagnóstico clínico de doença de Chagas em 219 e de outras afecções em 104. O teste foi comparado com testes já bem padronizados, de imunofluorescência (IF) e de hemaglutinação (HA), em 1325 soros. O limiar de reatividade (cut off), estabelecido como ideal, foi indicado nos testes pela absorvância de um soro de reatividade mínima. A sensibilidade do teste imunoenzimático foi de 0,9954 e a especificidade, como conegatividade, de 0,9969. Não foram vistos resultados falso-positivos em casos de sífilis, toxoplasmose, mononucleose e de soros com altos títulos de anti-estreptolisina 0, mas foram encontrados em 5 de 15 casos de leishmaniose tegumentar, 10 de 24 casos de calazar, 1 de 15 casos de artrite reumatóide e 1 de 12 casos de lupus eritematoso sistêmico. Os altos índices de sensibilidade em chagásicos e de especificidade na população geral, traduzem a elevada confiabilidade do teste para triagem de doadores de sangue e para a confirmação de suspeita clínica de doença de Chagas.

**UNITERMOS:** Teste imunoenzimático — Doença de Chagas; Doadores de Sangue.

### INTRODUÇÃO

A pesquisa de anticorpos séricos contra componentes do *Trypanosoma cruzi* representa importante contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas, especialmente diante das limitações dos diagnósticos clínico e parasitológico. Na triagem de candidatos a doadores de sangue infectados com o parasita, os testes sorol

lógicos assumem papel de grande relevância na prevenção da doença de Chagas pós-transfusional. Para esse fim, há necessidade, cada vez mais evidente, de testes adequados para o ensaio, de grande número de amostras, e em curtos prazos. Adequadas para automação as técnicas imunoenzimáticas, vem responder a tais quesitos, pois são

\* Biolab Diagnóstica S/A, Brasil.

(1) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP, Brasil.

(2) Biolab Diagnóstica S/A, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Antonio Walter Ferreira, Instituto de Medicina Tropical, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 05403 São Paulo, Brasil.

de execução simples e de baixo custo. Entretanto, um sério problema para o diagnóstico sorológico é a satisfatória padronização dos testes, pois que acentuadas divergências de resultados podem ser encontradas mesmo entre laboratórios de grande experiência. Foi o que se verificou ao se iniciar o trabalho de padronização continental do diagnóstico sorológico da doença de Chagas, há alguns anos<sup>3</sup>.

Apesar disso é possível se obter excelente concordância entre resultados de testes obedecendo a diferentes técnicas e utilizando complexos antigênicos do parasita, desde que os testes sejam padronizados segundo critérios bem estabelecidos<sup>8</sup>.

Para a triagem em bancos de sangue exige-se do teste sensibilidade máxima, sem que venha a implicar em elevada inespecificidade para grupos populacionais tomados ao acaso, como o de doadores de sangue. Para a determinação dessa sensibilidade, é imprescindível a utilização de painéis de soro representativos da população diagnóstica.

Ora, o diagnóstico de certeza da doença de Chagas só é dado pela positividade de um exame parasitológico. Porém, os pacientes com xenodiagnóstico positivo não podem ser considerados como representativos da população em geral. Nossa solução foi incluir no painel, soros de pacientes com documentação parasitológica de fase aguda no passado, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Carlos Pinto Dias. A estes se acrescentaram soros de pacientes com xenodiagnóstico positivo.

Determinou-se a especificidade do teste com soros de pacientes com diferentes afecções, certificados por diagnóstico clínico e laboratorial, e pela conegatividade com testes cuidadosamente padronizados previamente<sup>2</sup>, em soros de residentes em áreas do país, não endêmicas para a doença de Chagas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Soros** — Foram testadas 1648 amostras de soros, que incluíram 1087 soros de 3 bancos de sangue, 238 de um laboratório clínico, 219 soros de chagásicos e 104 soros de portadores de dife-

rentes afecções. Os soros de chagásicos foram colhidos de pacientes com dados epidemiológicos, clínicos e parasitológicos da doença. Entre estes, incluíam-se casos de manifestações cardíacas ou digestivas e de forma indeterminada, com diagnóstico pregresso de forma aguda, que fora estabelecido anos antes pela demonstração do parasita no sangue, por exame direto ou por xenodiagnóstico. Dos 104 soros de portadores de outras afecções, 24 eram casos de calazar, 15 de leishmaniose tegumentar, a maioria com lesões mucosas, 15 de artrite reumatóide, 12 de lupus eritematoso sistêmico, 14 de mononucleose, 8 de toxoplasmose aguda ou sub-aguda, 7 de sífilis e 9 com títulos altos de anticorpos de anti-estreptolisina 0.

Todos apresentaram altos títulos de anticorpos, característicos das respectivas afecções.

**Testes Imunoenzimáticos** — Como antígeno foi utilizado um extrato total de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Para a sensibilização das placas (Medium binding, de fundo plano, NUNC, Dinamarca), estas foram incubadas por uma noite a 4°C com uma solução antigênica em PBS pH 7,4 com 2 microgramas por mililitro de proteínas. Depois de lavadas, as placas foram bloqueadas por incubação a 37°C por 1 hora com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,4, contendo 5% de proteínas (PBSP). A estabilidade das placas sensibilizadas foi seguidamente comprovada pela obtenção de resultados inalterados mesmo após permanência das mesmas, por várias semanas a 37°C e por pelo menos um ano a 4°C. Após a incubação dos soros diluídos a 1:100, a reação foi revelada por conjugado anti-IgG humana com peroxidase, e substrato cromógeno de ortofenilenodiamina-peróxido de hidrogênio. As curvas dose-resposta obtidas, lançando-se absorvâncias em escala aritmética contra os logaritmos das concentrações dos soros, mostraram porções retilíneas predominantes. Além de soros controle positivo e negativo, incluiu-se, em cada teste, um soro referência, de reatividade mínima, para definição do limiar de reatividade (cut off) entre soros reagentes e não reagentes. Este limiar foi definido como o valor médio mais 3 desvios-padrão das absorvâncias de 90 soros de indivíduos com alta probabilidade de ausência de infecção por *Trypanosoma cruzi* ou *Leishmania* provenientes de áreas

endêmicas<sup>1</sup>. As reações apresentando absorvâncias 20% acima ou abaixo daquela correspondente ao soro controle de reatividade mínima foram consideradas como inconclusivas, devendo ser repetidas, para confirmação.

**Teste de Imunofluorescência Indireta (IF)** — Foi realizado segundo a técnica descrita<sup>2</sup>, com antígeno comercial (Imunocruzi, Biolab Diagnóstica) e conjugado anti-IgG humana (Fluoline G, Biolab Diagnóstica).

**Teste de Hemaglutinação Passiva (HA)** — Foi realizado como descrito<sup>5</sup>, com o reagente Hemacruzi (Biolab Diagnóstica).

## RESULTADOS

Submeteram-se ao teste imunoenzimático, soros de duas amostragens, respectivamente de não chagásicos e de chagásicos. A primeira incluiu soros de indivíduos normais e de pacientes com diferentes afecções, com exceção das leishmanioses, originários e residentes em áreas não endêmicas para doença de Chagas e leishmanioses (Espírito Santo, Brasil). A segunda procurou ser a mais representativa possível da população chagásica, incluindo soros de pacientes das formas indeterminada, digestiva e cardíaca, que apresentaram xenodiagnóstico positivo ou um diagnóstico parasitológico no passado, de forma aguda da infecção tripanossômica.

Para os soros de não chagásicos, a média e um desvio padrão das absorvâncias observa-

das foi de  $0,089 \pm 0,046$ . Para os soros de chagásicos esses valores foram de  $1,068 \pm 0,338$ . Assim, arbitrou-se como limiar de reatividade (cut off) nos testes, o valor médio das absorvâncias mais 3 desvios padrão, determinados para não chagásicos. A figura 1 apresenta as curvas de distribuição de freqüência de absorvâncias correspondente às amostragens, respectivamente, de soros de não chagásicos e de chagásicos.

Nos bancos de sangue A, B e C, foram testados respectivamente, 439, 200 e 448 soros, no total de 1087 soros. Com relação ao teste de imunofluorescência houve concordância de resultados em 1083 soros (índice de 0,9963), com 9 soros reagentes e 1074 não reagentes. Duas amostras reagentes no ELISA foram não reagentes no teste de IF, e 2 amostras não reagentes no ELISA foram fracamente reagentes no teste de IF. Com o teste de hemaglutinação houve concordância em 1085 (índice de 0,9981), sendo 9 reagentes e 1076 não reagentes. Dois soros foram reagentes no ELISA e não reagentes no teste HA. Estes mesmos soros foram reagentes no teste de IF. O índice de concordância entre os testes de IF e de HA foi de 0,9969.

Dos 238 soros testados no laboratório clínico, 235 apresentaram resultados concordantes com o teste de IF (índice de 0,9874) sendo 21 reagentes e 214 não reagentes. Houve 2 soros reagentes e 1 não reagente no ELISA, com resultados discordantes no teste de IF. Com o teste de HA a concordância foi observada em 236 soros (índice de 0,9916) sendo 22 reagentes e 214 não reagentes. Houve apenas 2 soros discordantes, ambos reagentes no ELISA. Nesse grupo de soros a concordância entre os testes de IF e de HA ocorreu em 237 soros (índice de 0,9958), o único soro discordante sendo reagente no teste de IF e não reagente no teste de HA. Assim, o índice de especificidade do teste imunoenzimático, expresso em termos de conegatividade, foi de 0,9969 em 1282 soros não reagentes no teste de IF e em 1294 soros não reagentes no teste de HA.

Dos 219 soros de chagásicos, 218 foram reagentes para o teste imunoenzimático, o único soro não reagente não tendo reagido também nos testes de IF e de HA. O índice de sensibilidade resultante foi de 0,9954.

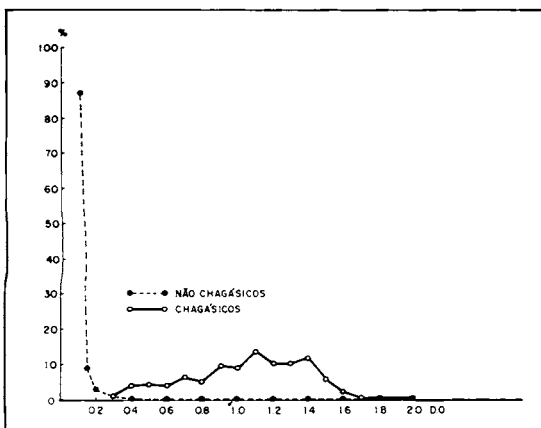


Fig. 1 — Curvas de distribuição de freqüência de absorvâncias para soros de não chagásicos (.....) e de chagásicos (—).

Quanto aos 104 soros de pacientes com outras afecções, não foram observados resultados falso-positivos nos casos de sífilis, de mononucleose, de anticorpos anti-estreptolisina 0 elevados e de toxoplasmose. Houve 1 resultado positivo-falso em cada um dos grupos, respectivamente, de pacientes com artrite reumatóide e de lúpus eritematoso. Foram vistos 5 soros reagentes nos 15 casos de leishmaniose tegumentar e 10 nos 24 de calazar.

## DISCUSSÃO

A avaliação de testes para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas não é tarefa simples. Bem o evidenciaram as divergências de resultados de soros intercambiados entre três laboratórios de grande experiência nessa sorologia, como observadas no estudo referido por CAMARGO et al, 1986<sup>3</sup>.

As divergências deveram-se principalmente à diversidade de critérios com que foram desenvolvidos os testes em cada laboratório, segundo as experiências pessoais e prevalência da infecção nas diferentes populações em que os testes foram estudados. É de se notar que os critérios de positividade e de negatividade de um teste são baseados na experiência obtida em populações de chagásicos e de não chagásicos. Ora, a seleção de amostra representativa da população chagásica é difícil, tendo em vista a ocorrência freqüente da forma indeterminada, sem sintomas ou sinais clínicos. Desse modo, a seleção baseada em critérios clínicos, além de pouco segura, resulta em amostra reunindo apenas casos clinicamente expressivos. Por outro lado, a inclusão na amostra de apenas casos com xenodiagnóstico ou hemocultura positivos pode introduzir um vies, pela seleção de casos que apresentem parasitemia, possivelmente não representativos do universo de chagásicos. É igualmente difícil a seleção de amostra representativa da população não chagásica, para avaliação da especificidade do teste. As experiências com populações de áreas não endêmicas, como as europeias ou norte-americanas, de habitats muito diversos, não são plenamente aplicáveis às populações de áreas endêmicas, onde podem ocorrer estímulos antigênicos muito diversos e capazes de originar anticorpos de reação cruzada com os antígenos parasitários utilizados no teste<sup>3, 7</sup>.

Realmente, quando se estudam as freqüências de intensidades de reatividade dos testes sorológicos, em populações de chagásicos e de não chagásicos, das regiões em que incide a doença de Chagas, verifica-se que em ambas essa reatividade se distribui segundo curvas de conformação "gaussiana"<sup>3</sup>. Somente, para a população não chagásica a mediana dos títulos é mais elevada do que para a população não chagásica, mas com grande freqüência as duas curvas respectivas se interceptam segundo área mais ou menos extensa.

Em conseqüência, a seleção de um limiar de reatividade (cut off), distinguindo soros reagentes e não reagentes é sempre um compromisso entre um máximo de sensibilidade e um máximo de especificidade. A reatividade observada nas populações de não chagásicos, ainda que geralmente de níveis baixos, é devida em parte a "ruidos" que interferem no sinal mensurável desenvolvido no teste, mas originada principalmente pela presença de anticorpos "inespecíficos", de reação cruzada com alguns dos vários componentes antigênicos do *Trypanosoma cruzi*.

Ao se reduzir o número de antígenos utilizados no teste, com a conseqüente redução de epitopos reagentes, pode resultar uma sensível diminuição dessa interferência como quando se empregam, no teste, frações imunoquímicas purificadas. Porém, neste caso, é comum se observar uma queda de sensibilidade do teste. Em nossa experiência a melhor discriminação, no teste imunoenzimático, foi obtida com extratos semi-purificados<sup>1</sup>. Por outro lado, o fracionamento de antígenos é um processo complexo e oneroso, a solução em vista estando nos antígenos recombinantes, clonados e expressos, por exemplo, na *Escheria coli*<sup>4, 6</sup>. No caso da doença de Chagas, tais reações "inespecíficas" são na maior parte devidas a anticorpos IgM, e não se fazem sentir nos testes específicos para anticorpos IgG, como no ensaio aqui descrito.

A avaliação do teste imunoenzimático realizada em um painel de soros que se buscou o mais representativo possível da população de pacientes chagásicos, segundo critérios já previamente definidos por CAMARGO et al, 1986<sup>3</sup> indicou um índice de sensibilidade de 0,9954. A

elevada especificidade do teste foi traduzida pelos altos índices de conegatividade observados para os testes de imunofluorescência indireta e de hemaglutinação passiva. Na verdade, nos 1325 soros em que foram realizados os três testes, o índice de concordância do teste imunoenzimático com o teste IF foi de 0,9947, e de 0,9970 com o teste HA.

Como para os demais testes realizados com poliantígenos de *Trypanosoma cruzi*, observaram-se reações positivas relativamente freqüentes nos casos de calazar e também nos de leishmaniose tegumentar, principalmente com lesões mucosas. A opção deliberada por antígenos múltiplos de extratos parcialmente purificados teve como objetivo assegurar ao teste imunoenzimático um máximo de sensibilidade, como observado por CAMARGO et al, 1986<sup>1</sup>, que possa garantir segurança máxima ao teste. Esta é absolutamente necessária na triagem de candidatos a doadores de sangue e, mesmo quando o teste é realizado como apoio sorológico ao diagnóstico clínico da doença de Chagas, as reações cruzadas com as leishmanioses habitualmente não apresentam maior obstáculo. Nestes casos, os testes com antígenos de *Leishmania sp* são positivos, e é bem de ver que é menos freqüente a ocorrência de reações positivas de soros de chagásicos com estes antígenos.

#### SUMMARY

##### **Standardization of serological tests in Chagas' disease: immunoenzymatic test for screening of blood bank donors.**

In the serological diagnosis of Chagas disease large divergences may be found even between laboratories with experience, as a consequence of different criteria for the standardization of the tests.

To standardize a immunoenzymatic test developed primarily for screening blood donors, serum panels were carefully chosen so as to best represent chagasic and non-chagasic populations.

Produced for the highest sensibility and stability, the new reagent (bioELISA cruzi, Biolab Diagnóstica S/A, Brasil), was tested in serum

from 1648 patients 219 with Chagas disease and 104 with other diseases, plus a comparison with well standardized immunofluorescence and hemagglutination tests in 1325 sera. In the immunoenzymatic assays, the cut off was indicated by the absorbance value of a chagasic serum showing a minimal reactivity. ELISA sensibility was 0,9954 and specificity 0,9969, as conegativity. False positive results were absent with sera from sífilis, toxoplasmosis, mononucleosis and high titered sera for antistreptolysin 0 antibodies. However they were seen in 5 to 15 cases of tegumentar leishmaniosis, 1 of 12 Kala-azar 1 of 15 reumatoid arthritis and 1 of 12 sistemic lupus erythematosus.

The high sensibility in chagasics and high specificity in the general population indicate the confiability of the immunoenzymatic assay for screening blood donors and even to confirm a clinical diagnosis of Chagas' disease.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração recebida dos Drs. Celso Granato, Paulo Leser, J. Carlos Pinto Dias, Thales Limeira, Maria Ruth C. de Carvalho, Sônia Caramico e Jamiro Wanderley.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; PERES, B. A.; MENDONÇA-PREVIATO, L. & SCHARFSTEIN, J. — *Trypanosoma cruzi* antibodies. In: BERGMAYER, H. U., ed. *Methods of enzymatic analysis*. 3rd. ed. Weinheim, VCR Verlagsgesellschaft, 1986. v. 11, p. 368-382.
2. CAMARGO, M. E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; MACEDO, V.; PÉRES, B. A. & CASTRO, C. — Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e flocculação em 3624 soros. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 19: 254-260, 1977.
3. CAMARGO, M. E.; SEGURA, E. L.; KAGAN, I. G.; SOUZA, J. M. P.; CARVALHEIRO, J. R.; YANOVSKI, J. F. & GUIMARÃES, M. C. S. — Three years of collaboration on the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Americas: an appraisal. *Bull. Pan Amer. Hith. Org.*, 20: 233-244, 1986.
4. COTRIM, P. C.; PARANHOS, G. S.; MORTARA, R.; WANDERLEY, J.; RASSI, A.; CAMARGO, M. E. & SILVEIRA, J. F. — Expression in *Escherichia coli* of a dominant Immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. *J. clin. Microbiol.*, 28: 519-524, 1990.

---

FERREIRA, A. W.; BELEM, Z. R.; MOURA, M. E. G. & CAMARGO, M. E. — Aspectos da padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas: um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 33(2): 123-128, 1991.

---

5. HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. E.; SHIMIZU, T. & NAGASSE, T. K. — A study on the reproducibility of a stable lyophilized reagent for the Chagas' disease hemagglutination test. Proposal for quality control analysis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 24: 63-67, 1982.
6. LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIGER, M. A.; SOUTO-PADRON, T.; SOUZA, W. de & GOLDENBERG, S. — Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasit.*, 35: 135-137, 1989.
7. STORNI, P.; BOSI, F. J. & YANOVSKI, J. F. — Reacción de aglutinación direta para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2 mercaptoetanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. *Medicina (B. Aires)*, 35: 67-72, 1975.
8. TAKEI, K. — Estudo da eficiência relativa dos diferentes testes sorológicos utilizados no diagnóstico da doença de Chagas. Resultados observados na análise de 10.181 soros. São Paulo, 1982 (Tese de doutoramento. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

Recebido para publicação em 22/8/1990.

Aceito para publicação em 8/1/1991.