

## EMPREGO DE QUATRO EXAMES IMUNOLÓGICOS NA DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NOS GARIS DO SERVIÇO DE LIMPEZA URBANA DO DISTRITO FEDERAL

Douglas L. Tinoco, Mônica P. Garcia, Liana Lauria-Pires,  
Jaime M. Santana e Antonio R. L. Teixeira.

*A prevalência da infecção chagásica em 368 garis do Serviço de Limpeza Urbana (SLU) do Distrito Federal foi inicialmente indicada pelos exames de hemaglutinação e imunofluorescência, quando encontrou-se 32,1% e 47,6% de resultados positivos, respectivamente, para cada exame. Em vista das discrepâncias observadas, utilizou-se o teste cutâneo com o antígeno T12E para esclarecimento do diagnóstico em 15,5% dos que tinham apenas um teste sorológico positivo. O teste cutâneo foi positivo em 38,6% dos garis. A análise dos resultados de 183 garis mostrou 47% dos casos com três exames concordantes positivos. Mais 19,7% tiveram dois exames concordantes positivos. Porém, 33,3% dos garis tinham apenas um dos três exames positivo. Empregou-se também o "immunoblot" na tentativa de esclarecer o diagnóstico nos 61 casos com apenas um resultado positivo. Foram encontrados 37,5% (3/8) dos casos positivos pela hemaglutinação, 11,5% (3/26) pelo teste cutâneo, e apenas 3,7% (1/27) pela imunofluorescência. Após a adição desses casos positivos pelo "immunoblot", o total de chagásicos passou a ser de 129, ou seja, 35% dos garis da amostra estudada.*

*Palavras-chaves:* T. cruzi. Infecção humana. Sorologia. Prova de pele de hipersensibilidade retardada.

Vários programas de campo foram implementados visando o estudo da evolução natural da Doença de Chagas no Brasil<sup>6-10,11</sup>. Esses estudos trouxeram informações importantes sobre índices de morbidade e mortalidade da doença crônica que repercute na saúde das pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* muitos anos ou décadas após a fase aguda. Não obstante os longos períodos de observação que esses estudos requerem, foram obtidos conhecimentos importantes sobre a história natural da doença de Chagas em áreas endêmicas.

Em vista da necessidade de excluir variáveis que interfeririam na evolução natural da doença, foi iniciado o estudo longitudinal da doença nos garis do SLU do Distrito Federal. Assim, a partir de 1988, iniciou-se um programa de atendimento médico aos garis, onde inexistia a transmissão da infecção via

inseto-vetor. A decisão de proceder o estudo nessa categoria de trabalhadores urbanos foi tomada em virtude do conhecimento de que os garis do SLU foram recrutados nas áreas rurais de diversos municípios dos estados vizinhos, onde ocorre a transmissão ativa do *T. cruzi* pelo triatomíneo. Em adição, o estudo longitudinal de longa duração seria viabilizado pelo fato de que os garis têm estabilidade no emprego e, portanto, baixa evasão.

A primeira etapa desse trabalho consistiu na identificação dos garis chagásicos. Em vista da discrepância de resultados obtidos nos exames sorológicos de hemaglutinação e de imunofluorescência, utilizamos o teste cutâneo de hipersensibilidade tardia contra antígeno do parasito e o "immunoblot" para definir aqueles casos com apenas um daqueles exames positivo. Nesta primeira publicação, relatamos resultados de exames imunológicos empregados para identificar os garis chagásicos do SLU de Brasília.

### MATERIAL E MÉTODOS

*Amostragem.* Esse estudo contou com 332 garis entre 21 e 71 anos de idade. Todos esses indivíduos assinaram o Termo de

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Universidade de Brasília, Brasília-DF

Os resultados deste estudo foram apresentados como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre do Dr. Douglas L. Tinoco, Universidade de Brasília, 1992.

Endereço para correspondência: Dr. Antonio RL Teixeira, CP 04685, CEP 70919-970, Brasília, DF Fax: (061) 273-4645.

Recebido para publicação em 25/01/95.

Conhecimento de Risco voluntariamente, dando consentimento formal para submeter-se aos exames preconizados. Em seguida, era preenchida ficha de captação de dados relacionados à epidemiologia, história familiar, exames clínico, eletrocardiográfico e laboratoriais. Os dois últimos eram repetidos uma semana depois.

*Colheita de sangue.* Foi colhido 10ml de sangue venoso de cada gari, em vacutainer descartável. O sangue era deixado à temperatura ambiente e o soro era colhido após a coagulação e centrifugação. Uma alíquota de soro era misturado com glicerol (25%) e estocado a -20°C. A segunda alíquota era mantida a 4°C até o momento do uso.

*Imunofluorescência indireta.* O antígeno usado consistiu de formas epimastigotas de *T. cruzi* do estoque Ernestina, crescidas em meio LIT<sup>1</sup> acrescido de soro fetal bovino a 5 por cento. As formas de cultivo eram colhidas em fase exponencial de crescimento e lavadas 4 vezes em PBS, pH 7.2. Na última lavagem as células eram mortas com formol a 1 por cento (v/v) e deixadas a 4°C, durante 12h. Após lavagem em PBS eram ressuspensas em água destilada, para obter-se concentração final de 10<sup>6</sup> epimastigotas/ml; 5µl desse antígeno era dispensado em compartimentos de lâminas de vidro. O teste de imunofluorescência<sup>2</sup> consistiu na deposição de 10µl de cada diluição do soro sobre o antígeno da lâmina, e encubação em câmara úmida, durante 30min a 37°C. A lâmina era lavada 3 vezes em PBS e secada ao ar livre. Em seguida, depositava-se sobre o antígeno na lâmina a diluição do conjugado (Cappel Laboratories, USA e Calbiochem, West Germany) que dava uma reação francamente positiva com soro padrão positivo, e totalmente negativa com soro padrão negativo. Então, procedia-se incubação e lavagem, como feito anteriormente. As lâminas eram montadas com lamínula sobre glicerina tamponada, pH 9.6, e observadas em microscópio de epifluorescência, modelo Axiophot da Carl Zeiss. Uma reação positiva era indicada pela presença de cor verde-maçã brilhante delineando a silhueta do parasito. Considerou-se positiva a reação com título maior que 1:20.

*Hemaglutinação indireta.* Hemácias do grupo 0 e Rh- eram colhidas de doador com testes sorológicos negativos para a infecção pelo *T. cruzi*. O sangue era misturado com solução de Alsever (1:1 v/v) e mantido na

geladeira a 4°C. Para preparar 100ml da solução de Alsever pesava-se 2,05g de glicose, 0,89g de citrato de sódio e 0,42g de cloreto de sódio. O pH era ajustado para 6.1 com ácido cítrico. Após esterilização por filtração a solução era mantida a 4°C.

O antígeno usado era obtido de formas epimastigotas de *T. cruzi*, colhidas do meio LIT. Após lavagem em PBS, as células eram suspensas em água destilada e rompidas após cinco ciclos de congelamentos e descongelamentos sucessivos. Em seguida, o lisado era centrifugado a 12000g x 25 min a 4°C. O sobrenadante colhido com pipeta era o antígeno solúvel usado para sensibilização das hemácias. O teor de proteínas do antígeno era determinado pelo método de Lowry<sup>3</sup>.

A suspensão de hemácias em solução de Alsever era lavada três vezes em PBS, pH 7.2, e eram tratadas com ácido tânico a 1:40.000. As hemácias tanizadas eram incubadas a 37°C durante 15min, com agitações ocasionais. Após três lavagens em PBS, pH 7.2, as células eram ressuspensas em 20ml de PBS, pH 6.4. A essa suspensão de hemácias tanizadas era adicionada a quantidade de 1mg de proteína do antígeno solúvel de *T. cruzi*, em agitação. A absorção do antígeno na superfície das hemácias se dava durante 30min a 37°C. Após essa incubação as células sensibilizadas eram lavadas em PBS e o sedimento era ressuspensão em soro normal a 1% ("pool" de soros controles, negativos para a infecção pelo *T. cruzi*), diluído em NaCl 0,15M.

A reação de hemaglutinação<sup>5</sup> foi feita em placa de 96 poços (Titertek, Linbro). Os soros eram previamente inativados a 56°C, durante 30 min. Inicialmente, colocava-se 50µl de soro normal a 1% em cada poço da placa e, em seguida, 50µl de cada soro teste na primeira fila da policubeta. A diluição dupla era feita com micropipeta de 8 ou 12 canais. Finalmente, acrescentava-se a cada poço da placa 50µl da suspensão de hemácias sensibilizadas. Essa era selada com plástico para evitar evaporação e encubada a 37°C durante 2h. Um resultado positivo era indicado pela formação de um tapete de hemácias revestindo o fundo do poço, diferentemente do resultado negativo onde a deposição era punctiforme. O título de anticorpos era dado pela recíproca da diluição mais alta do soro. Considerou-se positiva a reação com título maior que 1:8.

**Teste cutâneo.** O antígeno usado no teste cutâneo para diagnóstico da infecção chagásica foi produzido no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Universidade de Brasília<sup>15</sup>. Esse antígeno foi obtido de formas epimastigotas do clone T12E do estoque Ernestina de *T. cruzi*, selecionado entre vários estoques do parasito pela capacidade de produzir endureção nos tecidos de coelho chagásico. Utilizou-se a dose de 50µg de proteína desse antígeno, suspenso em 100µl de PBS, injetada na pele do antebraço do indivíduo. Um resultado positivo era indicado pela reação endurecida no local, medindo 1cm<sup>2</sup> 48h após a injeção.

**"Immunoblot".** O antígeno solúvel (AS) usado neste teste foi obtido de formas epimastigotas do estoque Ernestina de *T. cruzi*. As células em fase exponencial de crescimento eram colhidas do meio LIT por centrifugação e lavadas em PBS, pH 7.2. O sedimento era, então, suspenso em PBS (1:12 p/v) contendo 2mM de para-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) e sódio dodecil sulfato (SDS) a 1% (p/v). Após a lise total dos parasitos pela ação do detergente iônico, o homogeneizado era centrifugado a 100000g x 10 min, a 4°C. O sobrenadante era o AS colhido com pipeta de Pasteur. O teor de proteínas do AS era determinado pelo método de Lowry<sup>9</sup>.

As proteínas do AS foram separadas por eletroforese<sup>8</sup> em gel separador SDS-PAGE, cujo gradiente de concentração variava de 5 a 20%. Usou-se marcadores de peso molecular da Sigma Chemical Co (β-galactosidase, fumarase, desidrogenase láctica, e triose fosfato isomerase) para identificar a Mr das proteínas do AS. Em seguida, as bandas de proteínas separadas pela mobilidade eletroforética foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose<sup>15</sup>. Os sítios de reatividade inespecífica na nitrocelulose foram bloqueados com leite desnatado a 5% (p/v) em tampão Tris-NaCl (TBS), pH 7.5, durante 2h à temperatura ambiente. Fitas da membrana de nitrocelulose com 3mm de largura eram encubadas com diluições 1:400 dos soros testes, e após 18h eram lavadas exaustivamente em TBS, durante 30 min. Então, eram incubadas com anticorpo de coelho anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma Chemical Co), diluído 1:400, durante 2h. Após cinco rinsagens, as bandas de proteínas nas fitas de nitrocelulose eram reveladas com 4-cloro-naftol, em solução

de metanol a 2% em Tris-HCl 0,05M, pH 7.4, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%, durante 10min. As bandas reveladas na nitrocelulose eram fotografadas ou guardadas embrulhadas em papel de alumínio para protegê-las do efeito evanescente da luz.

**Análise estatística.** Foi determinado o intervalo de confiança para cada proporção pela fórmula:

$$p = \frac{2a + z^2 + z + vz^2 + 4a(n-a)}{2(n + z^2)}$$
, tomando-se:

$z = 1,645$ ; sendo  $a$  = número de casos positivos e,  $n$  = total dos casos examinados. A regressão linear foi determinada pelo método dos mínimos quadrados.

## RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados dos exames IF e HI em 368 garis do SLU do Distrito Federal. Foram observados 175 (47,6%) garis com IF positiva. A HI foi positiva, porém, em 118 (32,0%) casos.

Tabela 1 - Resultados dos exames de imunofluorescência e hemaglutinação em 368 garis do (SLU) do Distrito Federal<sup>16</sup>

Teste	Resultados*	Nº de casos	%
Imunofluorescência	positivo	175	47,6
	negativo	193	52,4
	total	368	100,0
Hemaglutinação	positivo	118	32,0
	negativo	250	68,0
	total	368	100,0

\* IF+ = título da reação igual ou maior que 1/40. HI+ = título da reação superior a 1/8.

Os resultados do teste cutâneo com o antígeno T12E estão apresentados na Tabela 2. Foram observados 142 (38,6%) garis com endureção no local de injeção do antígeno (Figura 1) na derme superficial do antebraço, medindo mais de 1cm de diâmetro. 48h após. Essas reações positivas eram bem toleradas e foram identificadas facilmente pelo paciente antes mesmo de serem registradas pelo médico.

Tabela 2 - Resultados do teste cutâneo com o antígeno T12E, em 368 garis do Serviço de Limpeza Urbana do Distrito Federal<sup>16</sup>.

Teste	Total de casos	%
positivo	142	38,6
negativo	226	61,4
total	368	100,0

\* O teste cutâneo consistiu na injeção de 50µg de proteína contida em 100µl do antígeno T12E (vide texto). Uma reação positiva era indicada pela endureção da pele, medindo mais 1cm<sup>2</sup>, 48h após a injeção do antígeno.

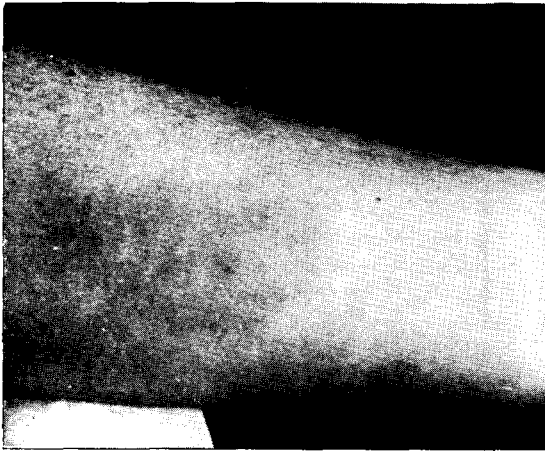


Figura 1 - Teste cutâneo com o antígeno T12E derivado de um clone do estoque Ernestina do *Trypanosoma cruzi*. Note a reação inflamatória endurecida na pele, 48 horas após a injeção do antígeno, observada apenas no portador da infecção chagásica.

As discrepâncias entre os resultados do teste cutâneo T12E e dos exames IF e HI podem ser melhor apreciadas na população distribuída em grupos etários (Tabela 3). As maiores discrepâncias foram observadas quando comparados os resultados dos exames IF e HI. Por exemplo, entre os 42 garis que tinham de 26 a 30 anos de idade haviam 17 (4,6%) positivos pela IF, mas apenas 5 (1,4%) pela HI. Não obstante as discrepâncias encontradas, a análise de regressão linear mostrou correlação positiva entre os três exames empregados. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram: HI e TC, 0,93; TC e IF, 0,94; e HI e IF, 0,83. De grande interesse, as discrepâncias com significação estatística ( $p < 0,05$ ) foram encontradas apenas quando comparados os resultados de HI e IF, nas faixas etárias de 26 a 30, 36 a 40 e de 41 a 45 anos.

Os perfis de distribuição dos resultados desses exames em faixas etárias podem ser

Tabela 3 - Frequência dos resultados de três exames imunológicos positivos para infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, por grupos etários<sup>1</sup>.

Grupos Etários	Total Casos	Exames positivos					
		HI		TC		IF	
		Total	%	Total	%	Total	%
21-25	28	02	0,6	03	0,9	07	1,9
26-30	42	05	1,4	10	2,7	17	4,6
31-35	47	16	4,3	16	4,3	17	4,6
36-40	63	15	4,0	24	6,5	29	7,8
41-45	48	16	4,3	17	4,6	25	6,8
46-50	52	22	6,0	26	7,0	29	7,8
51-55	43	21	5,7	21	5,7	25	6,8
56-60	21	09	2,4	11	3,0	13	3,6
61-65	21	10	2,7	12	3,3	12	3,3
66-70	02	01	0,3	01	0,3	-	-
71	01	01	0,3	01	0,3	01	0,3
Total	368	118	32,0	142	38,6	175	47,5

<sup>1</sup> Os exames de hemaglutinação indireta, imunofluorescência e reação cutânea com o antígeno T12E, foram empregados.

\* A análise estatística mostrou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre resultados de hemaglutinação e de imunofluorescência, nos grupos etários de 26 a 30, 36 a 40, e de 41 a 45 anos.

apreciados na Figura 2. Nota-se que o teste HI apresentou índices mais baixos de prevalência da infecção que os demais. O TC ocupou uma posição intermediária, e a IF apresentou os índices de prevalência mais elevados. Todavia, a tendência ascendente da curva de prevalência da infecção até os 50 anos de idade, e sua queda a partir desta faixa etária, está presente em cada um dos testes empregados.

A Tabela 4 mostra o total cumulativo de garis que tiveram pelo menos um dos exames positivo. Cerca de 183 (49,6%) garis tiveram um ou mais exames positivos.

Tabela 4 - Prevalência de testes imunológicos positivos para infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, em 368 trabalhadores do Serviço de Limpeza Urbana do Distrito Federal\*.

Trabalhadores	%	Total
Positivos	49,6	183
Negativos	50,4	185

\* Os resultados positivos são cumulativos, obtidos por IF, HI e TC.

A Tabela 5 apresenta a análise das discrepâncias entre os resultados desses exames. Verifica-se que apenas 86 (47%) casos tiveram os três testes concordantes. Em adição, 36 (19,7%) casos tiveram dois testes concordantes. Os 61 (33,3%) garis restantes tiveram apenas um teste positivo: HI com

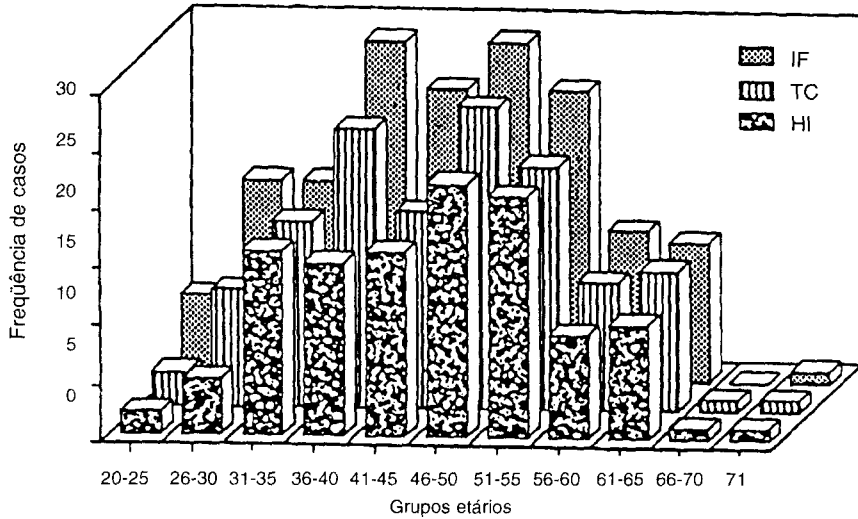


Figura 2 - Frequência de resultados de exames imunológicos positivos para infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, na amostragem de 368 garis do Serviço de Limpeza Urbana do Distrito Federal.

4,3%; IF com 14,8% e TC com 14,2%. Em resumo, 61 garis tinham um teste imunológico positivo, em discordância com os demais negativos.

Tabela 5 - Análise da prevalência dos testes imunológicos positivos em 183 trabalhadores do Serviço de Limpeza Urbana (SLU), Distrito Federal\*.

Testes imunológicos	%	Total
três testes positivos		
IF, HI e TC	47,0	86
dois testes positivos	19,7	36
HI e IF	9,0	16
HI e TC	6,8	12
IF e TC	4,5	08
um teste positivo	33,3	61
IF	14,8	27
TC	14,2	26
HI	4,3	08

\* Sessenta e um garis tinham um teste imunológico positivo, em discordância com os demais.

A Tabela 6 mostra resultados do "immunoblot" nos 61 casos que tiveram só um dos exames positivos. Essa análise confirmou apenas um (3,7%) caso positivo entre os 27 sugeridos pela IF. Aquele exame confirmou três (11,3%) dos 26 casos positivos com o TC. Entretanto, três (37,5%) dos oito casos positivos com HI foram confirmados com o "immunoblot".

Tabela 6 - Análise pelo "immunoblot" de 61 soros que apresentaram apenas um exame positivo.

Exame Imunológico	Casos positivos	Confirmados Immunoblot	%
Imunofluorescência	27	01	3,7
Teste cutâneo	26	03	11,3
Hemaglutinação	08	03	37,5

A Tabela 7 mostra as massas relativas das bandas de proteínas antigênicas do *T. cruzi* identificadas pelo "immunoblot" nos sete soros com um exame positivo (resultado duvidoso) e em quatro soros com diagnóstico confirmado por três exames imunológicos positivos, concordantes. Observa-se que os soros com três provas positivas formaram mais de 10 bandas de proteínas antigênicas. Entre os sete soros duvidosos haviam três com mais de 10 bandas. Os quatro restantes tinham 8, 5, 3 e 1 banda. De interesse, uma banda de 38 kDa foi vista em seis desses soros. As bandas com Mr 43 e 48 kDa foram encontradas em cinco soros duvidosos. Essas bandas também apareceram nos soros chagásicos com diagnóstico confirmado pelos três exames sorológicos empregados. A Figura 3 mostra os perfis obtidos no "immunoblot" de soros duvidosos e de soros chagásicos com diagnóstico confirmado por três exames imunológicos. De maior interesse, os garis que tiveram os resultados dos exames HI e TC confirmados

Tabela 7 - Massas relativas das bandas antigênicas identificadas pelo "immunoblot" em sete soros com diagnóstico duvidoso, e em quatro soros com diagnóstico confirmado por três exames imunológicos positivos\*.

Soros	Reagentes para	Número de bandas	Massas relativas/ (Hr. em kDa)
A	IF	03	48,5; 38; 26,6
B		12	120; 118; 109; 105; 76,5; 48,5; 43; 38; 28; 26,6; 25
C	TC	05	47; 43; 38; 28; 26,6
D		01	26,6
E		12	120; 118; 112; 105; 88; 76,5; 72; 53; 48,5; 43; 38; 26,6
F	HI	08	105; 76,5; 72; 53; 48,5; 43; 38; 26,6
G		12	120; 118; 105; 88; 76,5; 48,5; 43; 38; 28; 26,6
H, I, J, L	IF, HI, TC (4)	12	120; 118; 112; 105; 76,5; 48,5; 43; 38; 26,6; 25

\* Era considerado duvidoso o resultado de um exame positivo e dois negativos no mesmo soro. IF, imunofluorescência; TC, teste cutâneo com antígeno T12E; HI hemaglutinação indireta.

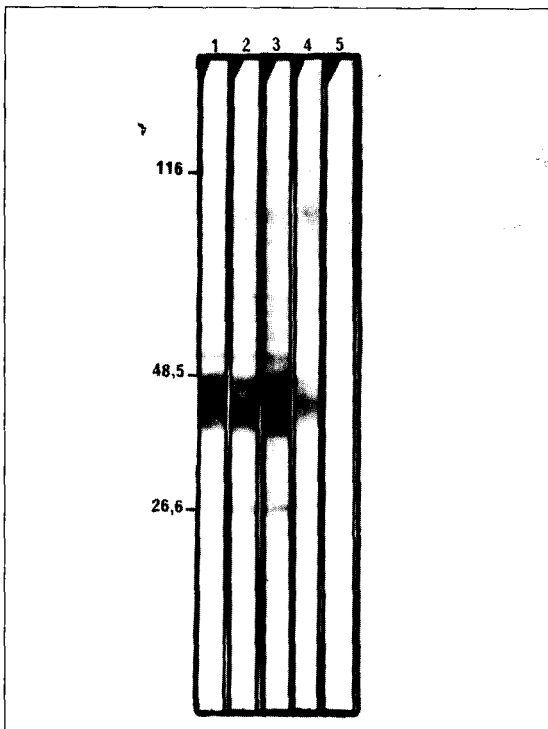


Figura 3. Perfis do "immunoblot" em soros de indivíduos que tinham apenas um exame imunológico positivo. A coluna 1 mostra várias bandas de proteínas do *Trypanosoma cruzi* reveladas por anticorpos de paciente com três exames positivos. As colunas 2, 3 e 4 mostram os perfis revelados por soro positivo com HI, TC e IF, respectivamente. A coluna 5 é o controle, com soro de indivíduo que teve os três testes negativos. Os números à esquerda representam as massas relativas (Mr) dos marcadores de peso molecular. Notam-se diversas bandas comuns nas colunas de 1 a 4. As bandas com Mr 26,6, 38, 43 e 48,5 kDa foram as que mais se repetiram (vide texto).

pelo "immunoblot" tinham alterações eletrocardiográficas compatíveis com miocardiopatia chagásica crônica. O único caso positivo por IF, que mostrou apenas uma

banda no "immunoblot", tinha o ECG normal (dados não apresentados).

### DISCUSSÃO

Diversos autores abordaram a questão relacionada ao diagnóstico imunológico da infecção pelo *T. cruzi*, com respeito às discrepâncias de resultados de exames empregados<sup>2,3,7,14</sup>. No estudo dos garis do SLU, a prevalência da infecção foi determinada, inicialmente, pela soropositividade dos testes de hemaglutinação e imunofluorescência. Em vista das discrepâncias observadas empregou-se também o teste cutâneo com o antígeno T12E, derivado de um clone do estoque Ernestina de *T. cruzi*. Com base nessas provas imunológicas, foram obtidos percentuais variáveis de prevalência da infecção na coorte de 368 garis examinados no período de 18 meses. Assim, verificamos que a prevalência da infecção variou conforme o exame tomado para diagnóstico. A soropositividade pelo exame HI foi de 32,1% e, pelo IF foi de 47,6%. O teste cutâneo foi positivo em 38,6% dos casos. As discrepâncias observadas com os testes HI e TC (6,5%) foram menores que aquelas observadas entre HI e IF (15,6%).

Em conjunto, os achados descritos acima e a apreciação dos trabalhos da literatura remete o leitor a uma pergunta: que fatores são responsáveis pelas discrepâncias observadas com esses exames imunológicos? Evidentemente que a origem da amostra, erro técnico, qualidade dos reagentes e variação na padronização dos métodos empregados podem influenciar a sensibilidade dos exames de imunodiagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*<sup>2,3,7,12,14</sup>. Todavia, essas influências foram descartadas neste estudo, até mesmo porque os exames foram feitos em duas amostras de

soro do mesmo paciente, colhidas com intervalo de uma semana ou mais. Ademais, os resultados discrepantes foram reconfirmados com os mesmos métodos descritos. Fica claro, pois, que esses resultados falso-positivos são devidos a reações cruzadas entre antígenos de *T. cruzi* e anticorpos contra antígenos ubituosos presentes nos soros dos indivíduos, na população estudada. De fato, Vexenat<sup>®</sup> mostrou que antígenos de *T. cruzi* interagem com anticorpos presentes nos soros de pacientes portadores de calazar, leishmaniose cutâneo-mucosa, tuberculose, pênfigo, esquistossomose, lepra, sífilis, etc.

Enfim, a partir das informações da literatura, analisamos os 183 casos que tiveram qualquer um dos exames imunológicos positivo. Entre estes haviam apenas 86 (47%) com resultados concordantes dos três exames empregados. Em adição, 36 casos (19,7%) tiveram dois exames concordantes. Os 61 (33,3%) garis restantes tiveram apenas um exame positivo: HI, 8 casos; TC, 26 casos; e IF, 27 casos.

Face a essas discrepâncias era impossível saber o total de garis portadores da infecção pelo *T. cruzi*. Uma resposta clara, porém, era essencial para determinar a prevalência dessa infecção nos garis do SLU. Por exemplo, haviam 122 garis com dois ou mais exames positivos, concordantes. Se tomarmos esse critério, 33,1% dos garis seriam chagásicos. Entretanto, restariam 61 garis com apenas um exame positivo e os demais negativos. Com o critério usado em inquérito soropidemiológico, no qual a prevalência da infecção é determinada pelo teste IF, teríamos de considerar que esses garis também são chagásicos. Os clínicos, todavia, consideram esses casos como sorologicamente duvidosos.

Em decorrência dessa análise, introduzimos o "immunoblot" na tentativa de esclarecer o significado real daqueles 61 casos com um exame imunológico positivo. Verificou-se que dos 27 soros positivos pelo teste IF apenas um (3,7%) revelou bandas no "immunoblot". Dos 26 casos positivos pelo TC, três (11,5%) foram confirmados. Em adição, dos oito casos positivos pela HI, três (37,5%) também foram confirmados. Os 54 casos restantes não revelaram bandas no "immunoblot" e, portanto, foram considerados falso-positivos. Em conclusão, o emprego dos quatro exames descritos aqui permitiu identificar 129

chagásicos com pelo menos dois resultados positivos, ou seja, 35% da amostra estudada. O desvio entre este percentual de positividade e HI foi de -2,9%; com TC foi de 3,6%, e com IF foi de 12,6%.

## SUMMARY

*Seropositivity for Trypanosoma cruzi infection was studied in 368 street-sweepers of the SLU, Federal District, Brazil, with the aid of haemagglutination, immunofluorescence and, also, a delayed-type skin test to the parasite T12E antigen. It showed 32.1%, 42.1% and 38.6% positive results, respectively for each assay. Among these, however, only 47% were positive with each of three exams performed. In addition, 19.7% were positive with two out of three exams performed. The remaining 33.3% sera yielded one positive result out of three exams employed and were submitted to the immunoblot assay. This analysis confirmed 3 cases (37.5%) positive by hemmagglutination, 3 (11.5%) positive by skin test, and 1 (3.7%) positive by immunofluorescence. At the end of the analysis, it was shown that 129 (35%) individuals yielded at least two positive assays and, therefore, they should be considered as T. cruzi-infected individuals.*

*Key words: Human T. cruzi infection. Serology. Delayed-type skin hypersensitivity.*

## AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Serviço Médico do SLU/DF, pela assistência técnica. Aos Professores Celso Chiarine e Eduardo Freitas da Silva, Universidade de Brasília, pela análise estatística.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 6:93-100, 1964.
2. 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, 8:227-232, 1966.
3. Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in immunofluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition

- procedure to ensure specific results. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18:500-505, 1969.
4. Castro CN. Influência da parasitemia no quadro clínico da Doença de Chagas. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1978.
  5. Cerisola JA, Chaben MF, Lazzari JO. Test de hemaglutinacion para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Medica Argentina* 49:1761-1767, 1962.
  6. Dias JCP. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.
  7. Guimarães MCS, Celeste BJ, Castilho EA, Minco JR, Diniz JMP. Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous Leishmaniasis, Kala-Azar, and Chagas's disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:942-947, 1981.
  8. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227:680-685-1970.
  9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275, 1951.
  10. Macêdo V. Influência da exposição à reinfecção na evolução da Doença de Chagas. Estudo Longitudinal de cinco anos. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1973.
  11. Prata AR. Natural history of chagasic cardiomyopathy. In: *American Trypanosomiasis Research*. Pan-American Health Organization Publication n° 318, p. 191. 1975.
  12. Prata A, Mayrink W, Sodré AG, Almeida JA. Discrepâncias relativas entre os resultados de reação de Machado e Guerreiro executados em três diferentes laboratórios. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 4:35-38, 1975.
  13. Teixeira ARL. Hipersensibilidade tardia a antígeno de *Trypanosoma cruzi*. I - Estudo experimental em coelhos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 28:249-257, 1995.
  14. Teixeira ARL, Pereira LM. Discrepâncias entre resultados de três reações sorológicas empregadas para diagnóstico da Doença de Chagas. *Revista Brasileira de Biologia* 42:789-795, 1981.
  15. Towbin H, Staehlin T e Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:4350-4354, 1979.
  16. Vexenat ACOR. Diagnóstico Sorológico Diferencial de Infecções Causadas por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, *Leishmania chagasi* e outras Doenças Crônicas. Tese Mestrado, Universidade de Brasília, 1993.