

DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM GAMBÁS, NATURALMENTE INFECTADOS, PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Alexandre José Fernandes, Egler Chiari e Cléa Andrade Chiari

Em 116 gambás capturados no município de Bambuí-MG, foi realizada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-Trypanosoma cruzi. 44 (37,9%) foram reativos para T. cruzi, com títulos variando de 1:10 a 1:320. O parasito foi demonstrado em exames parasitológicos em 43 (97,7%) desses animais. A RIFI apresentou índices de co-positividade (97,7%), co-negatividade (98,6%) e concordância (98,3%), quando comparada com o xenodiagnóstico e hemocultura. Considerando-se a diluição 1:20 como título discriminante de reagente e não reagente, a RIFI é indicada como um dos métodos de diagnóstico da infecção chagásica em gambás. A RIFI em eluato de sangue dessecado (ESD) apresentou índices de co-positividade (78,2%) e concordância (76,0%) baixos e discordâncias marcantes em relação aos resultados não reagentes.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Gambás. Diagnóstico sorológico. Reação de Imunofluorescência Indireta.

A maioria dos estudos de prevalência de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres tem sido realizada a partir da demonstração do parasito através de exames a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico, raramente sendo utilizados testes sorológicos. Várias tentativas, com resultados insatisfatórios, foram realizadas na padronização das técnicas de diagnóstico através da pesquisa de anticorpos circulantes em gambás: fixação do complemento e hemaglutinação indireta²³; imunofluorescência indireta¹⁶ e aglutinação em látex¹⁷.

Os métodos sorológicos têm sido usados em levantamento de prevalência da doença de Chagas humana, como métodos de escolha pela facilidade de colheita, armazenamento, transporte e processamento do material no laboratório e pela sua sensibilidade e especificidade¹⁰. A disponibilidade de técnicas semelhantes, entre elas a Reação de Imunofluorescência Indireta, representaria uma contribuição inestimável na identificação de potenciais reservatório do *T. cruzi*,

entre eles, o gambá. O emprego de eluato de sangue dessecado em papel de filtro, facilitaria a colheita do material, principalmente em trabalhos epidemiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a captura dos gambás foram utilizadas armadilhas de arame (20x20x60 cm) distribuídas em áreas rurais e no peridomicílio urbano do município de Bambuí, Minas Gerais. Nos animais capturados a investigação e isolamento do *T. cruzi* foram realizados através de:

Exame a fresco

De cada animal examinaram-se cinco lâminas de sangue obtido por punção da veia marginal caudal com auxílio de um estilete.

Xenodiagnóstico

Feito com 30 triatomíneos de 3º estágio por gambá, sendo 10 *Triatoma infestans*, 10 *Panstrongylus megistus* e 10 *Rhodnius neglectus*. Exame segundo Bronfen e cols⁵, para isolamento e amplificação das amostras de *T. cruzi*.

Hemocultura

Os animais foram puncionados via veia marginal caudal com seringa de 1ml heparinizadas para

Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ e Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Endereço para correspondência: Dr. Alexandre José Fernandes, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. CP: 1743 - 30190 Belo Horizonte, MG.

Recebido para publicação em 05/06/90.

cultivo e amplificação das amostras em meio LIT ("Liver Infusion Triptose")⁶. Os tubos de hemocultura foram mantidos a 28°C e examinados aos 15, 30, 45 e 60 dias de incubação.

Sorologia

De cada gambá capturado foram colhidas amostras de sangue via veia marginal caudal e o soro estocado à temperatura de -20°C. A pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* foi realizada através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)⁷. Como conjugado foi utilizada antigamaglobulina total de gambá, obtida em coelho e marcada com isotiocianato de fluoresceína, apresentando relação fluoresceína/proteína em torno de 9. Os soros foram diluídos a partir de 1:10 com fator de diluição igual a dois até 1:640. As diluições que apresentaram imunofluorescência semelhante a observada no soro-controle reativo, obtido de gambá naturalmente infectado com exame a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico positivo e título de anticorpos anti-*T. cruzi* maior que 1:20 foram consideradas reagentes. Como controle de reação não-reativa, foi utilizado o soro de um gambá apresentando RIFI não reativa, com duas hemoculturas e dois xenodiagnósticos também negativos.

O antígeno foi preparado com formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT.

Em 25 gambás com exames parasitológicos (xenodiagnóstico e hemocultura) comprovadamente positivos para *T. cruzi* foram colhidos em paralelo ao soro amostras de sangue em papel de filtro "Melitta", segundo o procedimento descrito por Alvarez e cols¹. A RIFI foi processada 24 horas após o material ter sido colhido. Foram utilizados dez círculos de 6mm de diâmetro do eluato de sangue dessecado (ESD) eluídos em 293 µl de PBS, durante 30 minutos para que fosse obtida a diluição inicial de 1:10.

A avaliação dos resultados sorológicos (RIFI) foi realizada de acordo com Guimarães e cols¹³.

RESULTADOS

Em 116 soros de gambás testados pela RIFI, 44 (37,9%) foram reativos para *T. cruzi* com títulos variando de 1:10 a 1:320 (Tabela 1). O *T. cruzi* foi demonstrado em exames parasitológicos em 43 (97,7%) desses animais. O único gambá com sorologia reativa e exames parasitológicos negativos apresentou três reações reativas, em diferentes momentos, com títulos 1:80, três hemoculturas e três xenodiagnósticos negativos. Os outros 72 (62,1%) gambás apresentaram RIFI não-reativa com duas hemoculturas e dois xenodiagnósticos também negativos (Tabela 1).

Os resultados sorológicos reativos, considerando-se como título discriminante de reagente e não

reagente a diluição 1:20, comparados com exames parasitológicos positivos para *T. cruzi*, apresentaram elevados índices de co-positividade (97,7%), co-negatividade (98,6%) e concordância (98,3%) (Tabela 2). Pôde-se verificar, ainda, que mesmo utilizando a diluição 1:10 como título discriminante, a RIFI apresentou resultados satisfatórios, não sendo observado exames falso-negativos (Tabela 3).

Entre os 25 gambás reagentes através da RIFI e parasitologicamente positivos para *T. cruzi* utilizados na avaliação em papel de filtro, oito (32,0%) apresentaram resultados falso-negativos e em sete (28,0%) foram observadas quedas de título. Um gambá apresentou resultado não-reativo tanto no soro quanto no papel de filtro (Tabela 4). Este animal, na repetição da pesquisa de anticorpos em quatro amostras de sangue realizadas paralelamente a quatro hemoculturas e quatro xenodiagnósticos, em momentos diferentes, também mostraram resultados negativos. Quando comparados os resultados obtidos na pesquisa de anticorpos em soros e ESD, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a proporção de reagentes/não reagentes, embora os índices de co-positividade (78,2%) e concordância (76,0%) apresentem valores baixos (Tabela 5).

DISCUSSÃO

Nesse trabalho, considerando-se a diluição 1:20 como título discriminante de reagente e não reagente, a RIFI mostrou-se um excelente método de diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* em gambás (Tabela 2), concordando com Jansen e cols¹⁴. A utilização de uma diluição baixa (1:10) como título mínimo discriminante (Tabela 3), pode ser também utilizada, mas devendo ser acompanhada do emprego de conjugado específico e de soros referência reagente e não reagente, visando a não obtenção de resultados falso-negativos. Naqueles animais cuja sorologia for reagente apenas na diluição 1:10 e negativo nos exames parasitológicos, aconselha-se repetir a RIFI.

Em apenas um animal não houve correlação entre os dados sorológicos e parasitológicos. Neste animal, mesmo com três hemoculturas e três xenodiagnósticos, não foi possível detectar o *T. cruzi*, apresentando somente a RIFI com título 1:80 em diferentes momentos. Resultados semelhantes foram observados em gambás inoculados com as cepas Y e F de *T. cruzi* e naturalmente infectados¹⁴. Geralmente, quando o diagnóstico parasitológico é comparado com método sorológico, o número de casos sorologicamente positivos é consideravelmente maior que o encontrado no parasitológico. A principal razão para esta diferença é que as reações sorológicas podem detectar infecções com parasitemias extremamente

Tabela 1 – Frequência da recíproca de títulos de anticorpos circulantes anti-T. cruzi, obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e exames parasitológicos de 116 gambás (*D. albiventris*) capturados no município de Bambuí, MG.

| Exames Parasitológicos* | Recíproca dos títulos de anticorpos | | | | | | | | Total |
|-------------------------|-------------------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-------|
| | NR | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | |
| Positivo | 0 | 1 | 9 | 16 | 10 | 6 | 1 | 0 | 43 |
| Negativo | 72 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 73 |
| Total | 72 | 1 | 9 | 16 | 11 | 6 | 1 | 0 | 116 |

* Exame de sangue a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico.

NR = Não reagentes em soros diluídos 1:20.

Tabela 2 – Distribuição cruzada de reações reagentes e não reagentes através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a presença ou não de infecção pelo T. cruzi entre 116 gambás (*D. albiventris*) capturados no municípios de Bambuí-MG.

| Exames Parasitológicos | RIFI | | Total |
|------------------------|-----------|---------------|-------|
| | Reagentes | Não Reagente* | |
| Positivos | 42 | 1 | 43 |
| Negativos | 1 | 72 | 73 |
| Total | 43 | 73 | 116 |

* Não reagentes em soros diluídos 1:20; Índice de co-positividade = 97,7%; Índice de co-negatividade = 98,6%; Concordância = 98,3%.

Tabela 3 – Distribuição cruzada de reações reagentes e não reagentes através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a presença ou não de infecção pelo T. cruzi entre 116 gambás (*D. albiventris*) capturados no município de Bambuí - MG.

| Exames Parasitológicos | RIFI | | Total |
|------------------------|----------|---------------|-------|
| | Reagente | Não Reagente* | |
| Positivo | 43 | 0 | 43 |
| Negativo | 1 | 72 | 73 |
| Total | 44 | 72 | 116 |

* Não reagentes em soros diluídos 1:10; Índice de co-positividade = 100%; Índice de co-negatividade = 98,6%; Concordância = 99,1%.

baixas, como é freqüente em pacientes chagásicos crônicos⁸. Mesmo sendo as características de infecção pelo *T. cruzi* em gambás muito diferentes da do

Tabela 4 – Frequência da recíproca dos títulos de anticorpos em soro e eluato de sangue dissecado (ESD) através de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 24 horas após a colheita, em 25 gambás (*D. albiventris*) naturalmente infectados pelo T. cruzi, parasitologicamente comprovados.

| RIFI | Frequência da recíproca dos títulos | | | | | | Total |
|------|-------------------------------------|----|----|----|----|-----|-------|
| | NR | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | |
| Soro | 1 | 3 | 3 | 11 | 6 | 1 | 25 |
| ESD | 5 | 3 | 5 | 8 | 4 | 0 | 25 |

Tabela 5 – Distribuição cruzada de soros e eluatos de sangue dissecado (ESD) reagentes e não reagentes processados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), considerando-se como título discriminante a diluição 1:20.

| RIFI em soro | RIFI em ESD | | Total |
|--------------|-------------|--------------|-------|
| | Reagente | Não Reagente | |
| Reagente | 16 | 5 | 21 |
| Não Reagente | 1 | 3 | 4 |
| Total | 17 | 8 | 25 |

Índice de co-positividade = 76,2%; Concordância = 76,0%.

homem (pela facilidade de demonstração do parasita), aqueles animais apenas com sorologia reagente poderiam comportar-se como pacientes chagásicos crônicos, em que a RIFI é a única evidência de infecção⁴. Por outro lado, deve-se considerar a possibilidade de outras parasitoses serem responsáveis por resultados falso-reagentes, uma vez que pacientes⁹ e cães¹⁸

com leishmaniose podem apresentar resultados reagentes para doença de Chagas, e pelo fato de *Leishmania* spp. infectar gambás² 19. Importante considerar que todo resultado sorológico tem valor de probabilidade¹⁰, uma vez que está diretamente relacionado com índices de sensibilidade do teste utilizado.

Quando a RIFI foi realizada em ESD, observaram-se menores índices, se comparada com resultados obtidos em soros processados em paralelo (Tabela 5). Mesmo tendo sido a RIFI realizada 24h após a colheita do material, foi verificada queda nos títulos de anticorpos nos eluatos em 28,0% das amostras testadas e 32,0% apresentaram resultados falso-negativos. Resultados semelhantes foram observados em ESD de caprinos com toxoplasmose¹¹ e na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em gambás através da reação imunoenzimática (ELISA)¹⁵. Deve-se ressaltar que mesmo sendo difícil a delimitação das fases aguda e crônica da infecção chagásica em gambás, estes animais apresentam longos períodos de parasitemia patente³, o que provavelmente lhes conferem uma fase aguda mais longa do que nos demais mamíferos. É sabido também, que os níveis de IgM e IgG no soro de gambás experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* são similares aos observados em mamíferos placentários²⁰. Desta forma, como 14 (56,0%) dos ESD testados na RIFI foram procedentes de gambás com reiterados exames de sangue a fresco positivos, a maioria do material obtido era de animais em fase aguda da infecção, conseqüentemente, com maior concentração no soro de imunoglobulina da classe IgM. Tem sido verificado que a IgM apresenta maior capacidade de absorção no papel de filtro que IgG¹² e desta forma erros introduzidos na eluição e mesmo na diluição do material podem ter interferido na baixa concordância e queda de títulos na RIFI realizada com ESD.

A soro conversão de reagente/não reagente de um animal apresentando anteriormente título: 1:160, exame a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico positivos foi confirmada em quatro amostras de sangue, paralelamente a quatro hemoculturas e quatro xenodiagnósticos realizados em momentos diferentes. Resultados semelhantes foram obtidos em gambás experimentalmente infectados²¹, sendo observado a negatificação dos exames parasitológicos e sorológicos. Recentemente²², verificou-se que três pacientes acompanhados desde a fase aguda da doença de Chagas, as técnicas sorológicas convencionais tornaram-se, na fase crônica, permanentemente não reagentes em diversos exames. Nestes três pacientes a pesquisa de anticorpos líticos foi negativa (um caso) ou negativo-duvidosa (dois casos) e xenodiagnóstico, também negativos. Os autores levantam a hipótese de cura espontânea da doença de Chagas. Estudos mais

detalhados não puderam ser realizados naquele gambá, para que pudessem explicar os resultados negativos encontrados, uma vez que o animal morreu.

Os dados obtidos no diagnóstico de infecção pelo *T. cruzi* em gambás, nesse estudo, mostraram que a RIFI em soro deve ser o exame de escolha, seguida pelo xenodiagnóstico e/ou hemocultura. Com relação a RIFI em ESD, mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa quando comparada com a RIFI em soros, deve-se levar em consideração os baixos índices de co-positividade e concordância (Tabela 5). Desta forma, devido à importância que assume no diagnóstico a sorologia da infecção chagásica, seja em pacientes, seja em animais, deverá sempre se apoiar em testes de alta confiabilidade.

SUMMARY

One hundred and sixteen opossums captured in Bambuí, MG State, had an indirect fluorescent antibody test (IFAT) to detect circulating *Trypanosoma cruzi* antibodies. Forty-four of them (37.9%) reacted to *T. cruzi*, showing, titres ranging from 1:10 to 1:320. The parasite was demonstrated by parasitological examinations in 43 (97.7%) of these opossums. The IFAT presented co-positivity (97.7%) co-negativity (98.6%) and agreement (98.3%) rates when compared to xenodiagnosis and hemoculture. Considering the dilution 1:20 to discriminate reactions from the nonreactive ones, the IFAT is indicated as a diagnostic method, opossums. The IFAT on dry filter paper presented low rates of co-positivity (78.2%), agreement (76.0%) and consistent disagreement related to the non-reactive results.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Opossums Serological diagnosis. Indirect fluorescent antibody test.

AGRADECIMENTOS

A Rosalida Stevan Nazar por sua participação técnica na realização da Reação de Imunofluorescência Indireta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez M, De Rissio AM, Wynne de Martini GJ, Orrego LA, Cerisola JA. Recolección de sangre en papel para diagnóstico de infección chagásica por inmunofluorescencia. Boletín Chileno de Parasitología 26: 1-6, 1971.
2. Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75: 537-541, 1981.
3. Barretto MP, Siqueira AF, Correa FM, Ferrioli Filho F, Carvalheiro JR. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VII. Investigações sobre a infecção natural de gambás por tripanossomos

- semelhantes ao *T. cruzi*. Revista Brasileira de Biologia 24: 289-300, 1964.
4. Bréniere SF, Poch O, Selaes H, Tibayrenc M, Lemesre JL, Antezana G, Desjeux P. Specific humoral depression in chronic patients infected by *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 26: 254-258, 1984.
 5. Bronfen E, Rocha FSA, Machado GBN, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 84: 237-240, 1989.
 6. 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.
 7. 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: 227-234, 1966.
 8. Camargo ME, Hoshino-Shimizu S, Macedo V, Peres BA, Castro C. Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*: Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e floculação, em 3624 soros. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 19: 254-260, 1977.
 9. Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests 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.
 10. Camargo ME, Takeda GKF. Diagnóstico de laboratório. In: Brener Z, Andrade ZA (ed) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 175-198, 1979.
 11. Chiari CA, Lima JD, Antunes CMF. Utilização do eluato de sangue dissecado em papel de filtro no diagnóstico sorológico da toxoplasmose caprina. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia 39: 471-483, 1987.
 12. Evengard B, Linder E, Lundbergh P. Standardization of a filter-paper technique for blood sampling. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 82: 295-303, 1988.
 13. Guimarães MCC, Coutinho SG, Antunes CMF. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 20: 55-58, 1987.
 14. Jansen AM, Moriearty PL, Castro BG, Deane MP. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis* an indirect fluorescent antibody test for the diagnosis and follow-up of natural and experimental infections. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79: 474-477, 1985.
 15. Luckins AG, Miles MA. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 76: 29-32, 1982.
 16. Miles MA. Transmission cycles and heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. In: Lumsden WHR, Evans DA. Biology of the kinetoplastida, London, New York, San Francisco, Academic Press, V.2, p. 117-196, 1979.
 17. Minter-Goedbloed E, França S, Draper CC. The latex agglutination for *Trypanosoma cruzi*: unsuitable for testing animals. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 83: 157-160, 1980.
 18. Pellegrino J, Brener Z. Reação de fixação do complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 10: 39-44, 1958.
 19. Sadigursky M, Sherlock I, Miranda JC. Ecologia da Leishmaniose visceral na área endêmica de Jacobina, Bahia. VI. Estudos histopatológicos de *Didelphis albiventris* naturalmente infectado por três espécies de *Leishmania*. In: Resumos do X Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, Salvador p. 159-160, 1987.
 20. Souza-Leão S, Silva MH, Jansen AM, Deane MP. Humoral response of opossum *Didelphis marsupialis* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. In: Resumos do XIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease, Caxambu, IM-109, 1987.
 21. Thomaz N, Jansen AM, Deane MP. *Trypanosoma cruzi*: the complement-mediated lysis (COML) in experimentally infected opossums *Didelphis marsupialis*. In: Resumos da Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, I-48, 1984.
 22. Zeledón R, Dias JCP, Brilla-Salazar A, Rezende JM, Vargas LG, Urbina A. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 21: 15-20, 1988.
 23. Zeledón R, Solano G, Burstin L, Swartzwelder JC. Epidemiological pattern of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24: 214-225, 1975.