

## HIPERSENSIBILIDADE TARDIA A ANTÍGENO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. III - SENSIBILIDADE DO TESTE CUTÂNEO COM ANTÍGENO T12E NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS

Antonio R.L. Teixeira e Maria da Glória Teixeira

*Foi feita avaliação de três métodos imunológicos para diagnóstico de doença de Chagas, em 120 pacientes hospitalizados. O teste cutâneo e a imuno fluorescência foram positivos em 10% dos casos. A hemaglutinação foi positiva em 14,1% dos pacientes. A co-positividade do teste cutâneo com a hemaglutinação e dessa com a imuno fluorescência foi de 7,5%. Apenas 5% dos pacientes estudados tinham os três exames concordantes positivos. Todavia, 19,1% dos pacientes tinham pelo menos um dos três exames positivos. Neste estudo a especificidade do teste cutâneo foi semelhante a da imuno fluorescência. A sensibilidade desses testes, entretanto, foi menor que a da hemaglutinação indireta. Estes dados mostram que o teste cutâneo com o antígeno T12E faz o diagnóstico da doença de Chagas por uma simples reação de hipersensibilidade cutânea tardia de fácil execução.*

*Palavras-chaves:* Hipersensibilidade cutânea tardia. Antígeno T12E. Doença de Chagas.

Em estudo prévio, empregou-se o teste cutâneo com o antígeno T12E para produzir hipersensibilidade tardia em coelhos chagásicos<sup>7</sup>. A reação papulosa endurecida que se formava no sítio de inoculação do antígeno nesses animais era facilmente mensurável. Em vista da inocuidade desse teste, sua especificidade foi avaliada numa população de indivíduos residentes em área endêmica de doença de Chagas<sup>8</sup>. No presente estudo, foi investigada a sensibilidade do teste cutâneo e de exames sorológicos empregados rotineiramente para diagnóstico da doença de Chagas, em pacientes hospitalizados com patologias crônicas de natureza diversa. Os resultados apresentados aqui mostram que a associação do teste cutâneo com os exames sorológicos de hemaglutinação e imuno fluorescência contribui para esclarecer o diagnóstico clínico.

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília-DF e Departamento de Saúde Preventiva do Hospital Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

*Endereço para correspondência:* Dr. Antonio R. L. Teixeira, Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Caixa Postal 04-685. 70919-970, Brasília, DF Brasil. Fax: (061) 273-4645.

Recebido para publicação em 25/01/95.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Antígeno

O antígeno T12E foi obtido de formas epimastigotas de um clone do estoque Ernestina de *T. cruzi*, de acordo com procedimento padronizado<sup>7</sup>. O antígeno foi submetido a controle de qualidade e os lotes aprovados foram usados neste estudo. A sua inocuidade foi demonstrada em coelhos: 1) a injeção de 50µg do antígeno em cinco ocasiões, com intervalos de uma semana a 15 dias, não produziu soroconversão nem positividade do teste cutâneo; 2) o perfil do eletrocardiograma de coelhos chagásicos, que foram submetidos ao teste cutâneo com o antígeno T12E a cada 30 dias, durante um ano, foi semelhante aquele do grupo controle de coelhos infectados com *T. cruzi*, mas que não foi submetido ao teste<sup>7</sup>. O grupo controle de coelhos não-infectados submetidos ao teste cutâneo não apresentou variação no perfil dos eletrocardiogramas, quando comparado com aquele dos coelhos normais que não foram submetidos ao teste.

### Amostragem

A amostragem consistiu de 120 pacientes internados no Hospital Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia. O

diagnóstico clínico-laboratorial de cada paciente foi obtido dos prontuários de 65 mulheres e 55 homens, cujas idades variaram de 2 a 77 anos. As patologias diagnosticadas estão apresentadas na Tabela 1. Foi feito teste cutâneo e colheu-se 5ml de sangue de cada paciente. As alíquotas de soros foram mantidas em refrigerador e usadas nos exames imunológicos para diagnóstico de doença de Chagas.

## Teste cutâneo

O teste cutâneo (TC) consistiu na injeção de 100µl do antígeno T12E contendo 50µg de proteína na face interna do antebraço de cada paciente, de forma a produzir uma bolha intradérmica. A leitura do teste era feita 48h após a injeção, e consistiu na medida, com régua milimetrada, dos diâmetros vertical e horizontal da reação endurecida no sítio de injeção. Em trabalho anterior<sup>8</sup> foi mostrado que um resultado positivo era reação com diâmetro  $\geq$  1cm.

## Exames sorológicos

- Hemaglutinação indireta (HI): foi empregado o método descrito por Cerisola e cols<sup>4</sup>. Os exames foram feitos em diluições duplas em placas de microtitulação. Soros positivos e negativos eram incluídos como controle de reação. Considerou-se uma reação positiva a aglutinação dos eritrócitos sensibilizados com antígeno de *T. cruzi*, em diluições igual ou maior que 1:8.
- Imunofluorescência indireta (IF): a técnica descrita por Camargo<sup>2</sup> foi empregada neste estudo. Uma reação positiva era indicada pela fluorescência verde-maçã do parasito, na diluição 1:20 do soro.

## RESULTADOS

Os exames imunológicos foram realizados por três investigadores, em ocasiões diferentes, que não tinham conhecimento de resultados dos prontuários. A Tabela 1 mostra a relação de patologias contempladas nos diagnósticos clínicos dos pacientes incluídos neste estudo. Para efeito de apresentação, os diagnósticos foram grupados por freqüências.

Os percentuais de positivities de cada um dos exames imunológicos empregados para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* estão

apresentados na Tabela 2. A hemaglutinação foi positiva em 14,1% (17/120) dos casos. A imunofluorescência e o teste cutâneo foram positivos em 10% dos casos.

Tabela 1 - Diagnóstico clínico em 120 pacientes internados no Hospital Professor Edgard Santos/UFBA.

| Diagnóstico   | Total |
|---|-------|
| Diabetes melitus  | 9     |
| Esquistossomose hepato-esplênica  | 8     |
| Hipertensão arterial  | 7     |
| Miocardite chagásica crônica  | 6     |
| Síndrome nefrótica  | 5     |
| Cirrose hepática  | 4     |
| Calazar, Ca de próstata, estenose de esôfago, hepatite viral, Hodgkin, leishmaniose, síndrome depressiva e diagnóstico a esclarecer   | x3 24 |
| AVC, cardiopatia idiopática, febre reumática, hanseníase, hepatoma, hérnia umbilical, infarto miocárdico, icterícia obstrutiva, LES, osteomielite, pneumonia lobar, tuberculose   | x2 24 |
| Acidose tubular, anemia auto-imune, agranulocitose, artrite reumatóide, blastomicose, Ca de bexiga, brônquio, cólon, estômago, esôfago, faringe, mama, pâncreas e rim; cardiopatia isquêmica, coarctação da aorta, dermatite Dering-Broca, diabetes juvenil, endocardite bacteriana, estenose vias biliares, glomerulonefrite, hemorragia digestiva, hipertiroidismo, neurofibroma, pancreatite, pielonefrite, pneumotórax, raquitismo, salmonelose prolongada, síndrome de Lyell, úlcera varicosa, urolitíase, desnutrição | x1 33 |

Tabela 2 - Resultados dos exames imunológicos para doença de Chagas em 120 pacientes hospitalizados\*

| Exames                  | Resultados | %    |
|-------------------------|------------|------|
| Hemaglutinação (HI)     | 17/120     | 14,1 |
| Imunofluorescência (IF) | 13/120     | 10,8 |
| Teste cutâneo (TC)      | 12/120     | 10,0 |

\* Foram considerados positivos títulos iguais ou maiores que 1:8 para HI e 1:20 para IF. Um teste cutâneo positivo era indicado por reação endurecida igual ou maior que 1cm<sup>2</sup>.

Os resultados dos exames imunológicos positivos para doença de Chagas foram distribuídos de acordo com sexo, idade e diagnóstico clínico dos pacientes. Esses dados estão sumarizados na Tabela 3.

Os achados da Tabela 3 mostram que seis (5%) pacientes tiveram os três exames imunológicos positivos. Quatro deles eram portadores de miocardite chagásica crônica e dois tinham leishmaniose cutâneo-mucosa. Sete (5,8%) pacientes tiveram dois exames imunológicos positivos. Dois desses pacientes tinham diagnóstico clínico de miocardite chagásica. Um deles tinha HI e IF e outro HI e TC positivos. Um paciente com miocardiopatia crônica sem etiologia declarada apresentou TC e IF positivos. Um paciente com leishmaniose

e outro com calazar tiveram exames HI e IF positivos. Ainda nesse grupo, um paciente com Ca de mama e outro com síndrome de Lyell tiveram os exames HI e TC positivos.

Por último, nove (7,5%) pacientes tiveram apenas um dos três exames imunológicos positivos. A HI foi positiva em cinco casos, entre os quais havia um paciente com Ca de pâncreas e megaesôfago e outro com miocardiopatia congestiva de etiologia desconhecida. De dois exames positivos pela IF, um era de paciente portador de calazar. O teste cutâneo foi positivo isoladamente em um paciente com diagnóstico de diabetes e em outro com varizes esofágicas.

## DISCUSSÃO

Em estudo prévio<sup>7</sup>, a especificidade do teste cutâneo com o antígeno T12E foi indicada por reações cutâneas de hipersensibilidade tardia em 98,9% dos chagásicos com confirmação parasitológica, e reações negativas em indivíduos do grupo controle. Todavia, em pacientes chagásicos sem confirmação parasitológica, o teste

cutâneo foi positivo em 89,7% dos casos com exames de hemaglutinação e de imunofluorescência concordantes. Neste estudo, nove pacientes apresentaram co-positividade do teste cutâneo com a hemaglutinação. Coincidentemente, também foi encontrada co-positividade da imunofluorescência com hemaglutinação em nove pacientes. Assim, a incidência da doença de Chagas na amostra estudada teria sido 7,5%, se considerarmos chagásico o indivíduo que tem pelo menos dois exames positivos. Todavia, o percentual aumentaria para 14,2% se considerarmos apenas os resultados da hemaglutinação. Ainda, o percentual aumentaria para 19,1% se tomássemos os resultados cumulativos dos três exames positivos realizados na amostra. Esses dados sugerem que os três testes imunológicos empregados nesse estudo revelam antígenos diferentes. Desse forma, a ocorrência de discrepâncias entre resultados dos exames pode ser tomada como indicação de que os pacientes apresentam variações no repertório de anticorpos séricos contra cada antígeno do protozoário. Esses dados justificam o emprego

Tabela 3 - Informações clínicas de pacientes hospitalizados que tiveram um ou mais exames imunológicos positivo para doença de Chagas.

| Paciente                                      | Sexo | Idade | Diagnóstico clínico            | Exame*      |
|---|------|-------|--------------------------------|-------------|
| <b>Com três exames imunológicos positivos</b> |      |       |                                |             |
| FCC   | M    | 71    | miocardite chagásica crônica   | TC, HI e IF |
| MAVS  | F    | 66    | miocardite chagásica crônica   | TC, HI e IF |
| AMJ   | M    | 55    | miocardite chagásica crônica   | TC, HI e IF |
| ASR   | F    | 43    | miocardite chagásica crônica   | TC, HI e IF |
| IMS   | M    | 48    | leishmaniose cutâneo-mucosa    | TC, HI e IF |
| SAS   | M    | 60    | leishmaniose cutâneo-mucosa    | TC, HI e IF |
| <b>Com dois exames imunológicos positivos</b> |      |       |                                |             |
| JVS   | F    | 50    | miocardite chagásica crônica** | TC e HI     |
| CLL   | M    | 35    | miocardite chagásica crônica   | HI e IF     |
| MSPJ  | F    | 56    | miocardiopatia crônica         | TC e IF     |
| CSS   | M    | 47    | leishmaniose cutâneo-mucosa    | HI e IF     |
| AS  | M    | 8     | calazar                        | HI e IF     |
| BM  | F    | 51    | Ca de mama                     | TC e HI     |
| TJF   | F    | 38    | síndrome de Lyell              | TC e HI     |
| <b>Com um exame imunológico positivo</b>      |      |       |                                |             |
| AF  | M    | 67    | icterícia obstrutiva           | HI          |
| DJA   | M    | 64    | neoplasia                      | HI          |
| PRS   | M    | 63    | Ca pâncreas: megaesôfago       | HI          |
| MPQ   | F    | 53    | miocardiopatia congestiva      | HI          |
| MSS   | F    | 40    | salmonelose prolongada         | HI          |
| AJP   | M    | 9     | calazar                        | IF          |
| MLFS  | F    | 9     | hepatite colestásica           | IF          |
| MJS   | M    | 56    | varizes esofágicas             | TC          |
| AA  | F    | 60    | diabetes                       | TC          |

\* HI = hemaglutinação; IF = imunofluorescência; TC = teste cutâneo com antígeno T12E.

\*\* Paciente com insuficiência cardíaca severa e cianose.

de mais de um exame imunológico no diagnóstico da doença de Chagas.

A variação de sensibilidade dos exames de hemaglutinação, imunofluorescência e do teste cutâneo para diagnóstico de doença de Chagas foi indicada pelos percentuais de positividade na amostra estudada. Os resultados deste estudo são consistentes, pois, com trabalhos da literatura que relatam variação de sensibilidade de acordo com os métodos empregados, condições técnicas de realização dos exames e, também, com as características da população estudada<sup>1,3,6,9</sup>. Diferentemente de trabalhos citados<sup>1,3,9</sup>, que lidam com populações sem doença conhecida, nosso estudo procurou determinar a sensibilidade de três métodos imunológicos no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, em pacientes hospitalizados com diversas patologias. Tendo em vista que 19,1% (22/120) desses pacientes apresentaram pelo menos um exame positivo, ainda fica para ser determinado o significado real de um resultado discordante entre os três exames realizados. Uma palavra de precaução deve ser observada, pois, entre os pacientes que tiveram apenas hemaglutinação positiva havia um paciente com Ca de pâncreas e megasôfago e outro com miocardiopatia congestiva de etiologia a esclarecer. Foi visto ainda que um paciente com imunofluorescência positiva apenas tinha diagnóstico clínico de calazar. Ainda, no que concerne à sensibilidade dos métodos de diagnóstico, um paciente com insuficiência cardíaca congestiva por miocardite chagásica, com exames de hemaglutinação e imunofluorescência positivos, teve o teste cutâneo negativo. Em casos idênticos, o teste cutâneo não deve ser indicado, pois alteração do leito vascular periférico e cianose comprometem a hipersensibilidade tardia.

De maior interesse, um estudo recente mostrou que os exames sorológicos de hemaglutinação, imunofluorescência e ELISA com antígeno de formas de cultivo de *T. cruzi* apresentam reações cruzadas com anticorpos presentes nos soros de portadores de calazar e de leishmaniose cutânea-mucosa<sup>10</sup>. Este estudo mostrou que os mesmos exames imunológicos com antígenos de *Leishmania chagasi* ou de *Leishmania braziliensis* dão reação cruzada com soros de portadores de infecções por *T. cruzi*. Dessa forma, ficou impossível fazer diagnóstico diferencial entre essas três

infecções crônicas com base em exames sorológicos. Em adição, verificou-se também que soros de pacientes portadores de sífilis, tuberculose, esquistossomose, pênfigo, malária e paracoccidiodomicose, que apresentavam reações cruzadas com antígenos desses protozoários da ordem Kinetoplastida, também, revelaram diversas bandas daqueles antígenos no "immunoblot". Em conjunto, essas observações mostram que a alta sensibilidade das reações imunes geralmente se acompanha de menor especificidade de diagnóstico. Neste estudo, a especificidade do diagnóstico da doença de Chagas pelo teste cutâneo de hipersensibilidade tardia ao antígeno T12E foi maior que aquela obtida com o teste de hemaglutinação indireta. A sensibilidade do teste cutâneo, porém, foi menor que a do teste sorológico. Os resultados apresentados aqui mostram, portanto, que a utilização dos três métodos de diagnóstico confirma maior número de casos com diagnóstico clínico de doença de Chagas do que teria sido confirmado por qualquer um dos exames empregados.

## SUMMARY

*In this study we evaluated three immunologic methods for confirmation of clinical diagnosis of Chagas' disease, in 120 in-patients. The skin testing with the T12E antigen and the immunofluorescence were positive in 10% of cases. The hemagglutination was positive in 14.1% of these patients. The co-positivity of results of skin-testing with hemagglutination and of this latter with immunofluorescence reached 7.5% of cases. However, only 5% of co-positivity was achieved with results of skin testing, immunofluorescence and hemagglutination. Furthermore, 19.1% of the in-patients showed at least one out of these exams to be positive. The specificity of the skin testing paralleled that of the immunofluorescence. The sensitivity of these exams, however, was lower than that obtained by the indirect hemagglutination. These data show that the skin testing with T12E antigen allows the diagnosis of Chagas' disease by a simple and handy method.*

*Key-words: Delayed-type skin hypersensitivity. T12E antigen, Chagas' disease.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida JO, Siqueira AF. Estudo de discrepância relativa entre pares de reações simultâneas de

- fixação do complemento no sistema moléstia de Chagas. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2:204-212, 1960.
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 8:227-234, 1966.
  3. Cerisola JA, Alvarez M, Lugones H, Rebosolán JB. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Boletín Chileno Parasitología 24:2-8, 1969.
  4. Cerisola JA, Chaben ME, Lazzari JO. Test de hemaglutinacion para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prensa Medica Argentina 49:1761-1764, 1962.
  5. Fife Jr EH, Muschel LH. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Proceedings Societes Experimental Biology and Medicine 101:540-543, 1959.
  6. Prata A, Mayrink W, Sodré AG, Almeida JO. Discrepâncias relativas entre os resultados da reação de Machado Guerreiro executada em três diferentes laboratórios. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 4:35-38, 1975.
  7. 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.
  8. Teixeira ARL. Hipersensibilidade tardia a antígeno de *Trypanosoma cruzi*. II. Emprego do teste cutâneo com antígeno T12E para diagnóstico da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 28:259-265, 1995.
  9. 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.
  10. Vexenat ACOR. Diagnóstico sorológico diferencial de infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Vianna) braziliensis*, *Leishmania chagasi* e outras doenças crônicas. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, DF, 1993.