

## ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO, COM OS ANTÍGENOS BENZENO-CLOROFORMADO E METÍLICO E O XENODIAGNÓSTICO

Aprígio de Abreu SALGADO, Wilson MAYRINK e João Carlos Pinto DIAS

### RESUMO

Faz-se a comparação entre os resultados da reação de fixação do complemento e os do xenodiagnóstico, obtidos de 66 chagásicos crônicos, cujo diagnóstico tinha sido antes estabelecido pelo encontro do agente etiológico e que eram mensalmente submetidos aos exames. De 444 reações conclusivas, sendo 220 com o antígeno metílico e 224 com o benzeno-cloroformado, verificou-se a positividade respectiva de 96,36% e 95,98%. De 304 xenodiagnósticos, obteve-se a taxa geral de exames positivos de 34,21%. De três a seis xenodiagnósticos seriam necessários para se obter pelo menos um positivo. Algumas vezes, no mesmo dia, o xenodiagnóstico foi positivo, enquanto a reação sorológica foi negativa. Alguns pacientes mostraram tendência para xenodiagnósticos positivos e outros, para exames negativos. Verificaram-se, também, resultados contraditórios entre os dois antígenos utilizados. Chama-se a atenção para a aplicação desses resultados nos critérios de seleção de doadores de sangue, de ensaios terapêuticos e de avaliação de trabalhos profiláticos, bem como para a necessidade de estudos adicionais sobre o comportamento dos antígenos à prova sorológica, na doença de Chagas.

### INTRODUÇÃO

No estudo da sensibilidade da reação de fixação do complemento (RFC), na fase crônica da doença de Chagas, o xenodiagnóstico tem sido utilizado como elemento comprobatório, pois permite demonstrar a presença do agente causal. Assim, vários Autores, entre os quais FREITAS<sup>7</sup>, no Brasil, ROMAÑA & ROMAÑA<sup>12</sup>, na Argentina e KNIERIM<sup>9</sup>, no Chile, estudaram a sensibilidade dessa prova sorológica em pacientes agrupados pelo critério de apresentarem a xenodiagnose positiva.

No presente trabalho, faz-se a comparação entre os resultados do xenodiagnóstico e os da RFC, obtidos nos mesmos pacientes,

portadores da doença de Chagas, na fase crônica, e estudados, seguidamente, durante um ano.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os exames foram realizados em 66 chagásicos crônicos, residentes no Município de Bambuí, Estado de Minas Gerais, cujo diagnóstico, feito pelo então Centro de Estudos e Profilaxia de Moléstia de Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz, tinha sido estabelecido pelo encontro do agente etiológico, a saber: um caso, em 1965; cinco, até 1963; três, até 1959; e os demais, antes de 1956. Cada

Trabalho do Centro de Pesquisas René Rachou, do Instituto Nacional de Endemias Rurais, Belo Horizonte, Minas Gerais, da Cadeira de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais e do Pôsto de Pesquisas Dr. Emmanuel Dias, do Instituto Oswaldo Cruz — Bambuí, Minas Gerais, Brasil

SALGADO, A. de A.; MAYRINK, W. & DIAS, J. C. P. — Estudo comparativo entre a reação de fixação do complemento, com os antígenos benzeno-cloroformado e metílico e o xenodiagnóstico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:36-40, 1970.

mês, todos os pacientes eram solicitados a comparecer ao pôsto de investigação a fim de serem submetidos, tanto à colheita de material para a prova sorológica, quanto ao xenodiagnóstico. Os exames mensais foram realizados entre agosto de 1966 e setembro de 1967, inclusive.

Para a prova sorológica, o sangue integral, obtido pela técnica de SALGADO & PELLEGRINO<sup>14</sup>, era remetido ao Centro de Pesquisas René Rachou, em Belo Horizonte, onde, passadas 48-72 horas, era feita a separação do soro. Na realização da RFC, usou-se a técnica de FREITAS & ALMEIDA<sup>8</sup>, tendo sido utilizados os antígenos benzeno-cloroformado de FREITAS<sup>7</sup> e o metílico de BATISTA & SANTOS<sup>4</sup>.

Para o xenodiagnóstico, empregou-se a técnica adotada por DIAS<sup>6</sup> e FREITAS<sup>7</sup>, com determinadas modificações<sup>13</sup>. Empregaram-se pelo menos dez exemplares de inseto por exame e, quanto à espécie, foram utilizados o *Triatoma infestans* (na maioria dos casos), o *Panstrongylus megistus* e o *Rhodnius prolixus*.

#### RESULTADOS

A frequência dos pacientes aos exames mensais não foi uniforme, tendo diminuído ao longo dos meses e variando de 1 a 12 comparecimentos, como representa o Quadro I.

Para a RFC, foram feitas 11 séries mensais de exame, com um total de 444 reações conclusivas, sendo 220 com o antígeno metílico e 224 com o benzeno-cloroformado. As taxas de reações positivas foram, respectivamente, de 96,36% e 95,98% (Quadro II).

Para o xenodiagnóstico foram feitas as 12 séries mensais com um total de 304 exames, dos quais 104 positivos, o que dá a taxa geral de 34,21% de exames positivos. Convém esclarecer, entretanto, que essa percentagem é influenciada por valores extremos, como na 9.<sup>a</sup> série, em que, utilizando-se o *Rhodnius prolixus*, todos os xenodiagnósticos foram negativos. A repetição do xenodiagnóstico uma ou mais vezes propiciou a obtenção de melhores taxas de positividade.

#### QUADRO I

Frequência de chagásicos crônicos, por resultado, conforme o número de comparecimentos mensais à xenodiagnose — Bambuí, Minas Gerais

N.º de exames por paciente	N.º de pacientes por resultado	
	Positivo	Negativo
1	4	14
2	6	5
3	1	2
4	1	1
5	5	0
6	4	1
7	5	2
8	6	0
9	1	0
10	3	0
11	4	0
12	1	0

Dos 66 pacientes, que compareceram uma ou mais vezes ao exame, cinco apresentaram RFC negativa ou duvidosa, embora tivessem pelo menos um xenodiagnóstico positivo, sendo que algumas vezes, para o mesmo paciente e no mesmo dia, ocorreu o xenodiagnóstico mostrar-se positivo e a RFC negativa ou duvidosa (Quadro III). Desses pacientes, três apresentaram uma ou mais RFC negativas, mas apenas uma vez coincidiu o mesmo resultado para ambos os antígenos utilizados; em todos estes três casos, o xenodiagnóstico positivo coincidiu, no mesmo dia, com a reação negativa. O paciente J.J.S., de cinco xenodiagnósticos a que se submeteu, apresentou quatro positivos; e de 5 RFC (para cada um de ambos os antígenos), duas somente foram positivas (para cada antígeno). Resultados semelhantes ocorreram com o paciente M.I.O.: de quatro xenodiagnósticos feitos, dois foram positivos; de três RFC feitas, uma negativa e outra duvidosa. Já o paciente L.T.A. mostrou tendência ao xenodiagnós-

SALGADO, A. de A.; MAYRINK, W. & DIAS, J. C. P. — Estudo comparativo entre a reação de fixação do complemento, com os antígenos benzeno-cloroformado e metílico e o xenodiagnóstico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12:36-40, 1970.

### QUADRO II

RFC em Bambuí: resultados concludentes conforme os antígenos utilizados

Antígenos	Total	N.º de reações positivas	N.º de reações negativas	Porcentagem de positivas
Metílico .....	220	212	8	96,36
B.-cloroformado .....	224	215	9	95,98

### QUADRO III

RFC negativa ou duvidosa, em 5 chagásicos crônicos com xenodiagnóstico positivo, conforme a série mensal de exames, no período agosto/66 a setembro/67, em Bambuí, MG

Iniciais	N.º de exames realizados		Xenodiagnósticos positivos conforme a série mensal de exame	RFC, por antígenos, conforme a série mensal de exame			
	Xeno	RFC		Negativa		Duvidosa	
				M	P	M	P
J.J.S.	5	5	1-2-10-11	2-10	9-10	9	
L.T.A.	8	7	11	6	6-11		
M.A.B.	4	3	6-10			9-10	
M.L.A.	2	2	2				2
M.I.O.	4	3	1-7	7	7	9	

Nota: M = antígeno metílico; P = antígeno benzeno-cloroformado.

tico negativo, pois, entre oito resultados, apenas um foi positivo; e de sete reações, apenas duas foram negativas. Observa-se, pois, na sucessão das séries mensais de xenodiagnóstico, a aparente tendência de alguns pacientes para apresentarem resultados negativos, ao contrário de outros, com tendência a resultados positivos.

Outras comparações, ao longo da repetição dos exames, parecem igualmente dignas de atenção. O paciente J.J.S., que teve, à 10.<sup>a</sup> série mensal de exame, xenodiagnóstico positivo e sorologia negativa, apresentou, à 2.<sup>a</sup> série, RFC negativa (antígeno metílico), e, à 9.<sup>a</sup> série, RFC negativa, para

o antígeno benzeno-cloroformado, e duvidosa, para o metílico. O paciente M.A.B. teve, à 9.<sup>a</sup> e à 10.<sup>a</sup> série mensal, resultados positivos para o antígeno benzeno-cloroformado, e duvidosa, para o metílico (sendo que à 10.<sup>a</sup> série o xenodiagnóstico foi positivo). O paciente M.L.A., à 2.<sup>a</sup> série, teve a reação positiva, com o antígeno metílico, e duvidosa, com o benzeno-cloroformado (sendo que o xenodiagnóstico foi positivo). O paciente M.I.O teve, à 9.<sup>a</sup> série, reação duvidosa com o antígeno metílico (sendo que, à 7.<sup>a</sup> série, a reação fôra negativa com ambos os antígenos, e o xenodiagnóstico positivo).

## DISCUSSÃO

Os pacientes aqui estudados, se, por um lado, ofereceram a vantagem da facilidade de escolha da amostra, por outro, apresentaram a desvantagem de residirem em local de difícil acesso, geralmente em zona rural. Assim, não foi possível uniformidade de comparecimento aos exames mensais, o que, evidentemente, prejudica a interpretação dos resultados obtidos. Entretanto, a realização periódica da RFC e do xenodiagnóstico permitiu algumas observações de interesse, como a diversidade de resultados durante o decorrer do tempo e a verificação de que o mesmo paciente pode apresentar, no mesmo dia, xenodiagnóstico positivo e reação negativa.

No estudo da sensibilidade da RFC na doença de Chagas, o xenodiagnóstico tem sido utilizado, muitas vezes, como elemento comprobatório, visando, tanto ao estudo da correspondência entre os resultados dos dois métodos de diagnóstico, quanto à determinação da sensibilidade da RFC, já que seria estabelecida entre aqueles pacientes cuja tripanossomose fôsse comprovada pela demonstração do parasita no paciente. Parece haver, entre os Autores, concordância em que é satisfatória a sensibilidade da RFC, feita com técnica adequada, na doença de Chagas. A positividade geralmente atinge a 95%<sup>10</sup>, podendo alcançar 98%<sup>1</sup> e até mesmo 100%<sup>4</sup>, enquanto a do xenodiagnóstico raramente ultrapassa a 30%. Diante desses números, entretanto, convém ter em mente o estudo de FREITAS<sup>7</sup>, que encontrou apenas dois casos de RFC negativa, em 76 casos de infecção parasitológicamente comprovada. Lembra esse Autor que tais dados não permitem concluir pela grande sensibilidade da RFC, pois na maioria das vezes só era utilizado o xenodiagnóstico quando a reação era positiva. De fato, em certas condições especiais, como, por exemplo, no particular dos Bancos de Sangue, convém ter sempre em mente os casos falsamente negativos, cujo índice de ocorrência pode ser deduzido como igual ou superior a 2%<sup>1,10</sup>. PELLEGRINO<sup>11</sup>, entre 10.669 candidatos a doadores de sangue, em Belo Horizonte, MG, conseguiu comprovar a presença de 6,79% de chagásicos. Também, CERISOLA<sup>5</sup>, entre 10.971 candidatos a doadores de sangue, em Buenos Aires, en-

controu 5,25% de chagásicos. Tais valores, obtidos em população selecionada pela característica de boa saúde aparente, dá uma idéia da prevalência da tripanossomose no grupo populacional estudado, e, ao lado de nossos dados, mostram a necessidade de desenvolvimento de recursos para impedir que casos de RFC falsamente negativa escapem ao correto diagnóstico. Esses recursos poderiam ser novos métodos laboratoriais<sup>2,3</sup>, a conjugação dos já existentes e/ou a repetição dos mesmos. Essas considerações, válidas principalmente para os Bancos de Sangue, devem ser estendidas a estudos epidemiológicos especiais, como os de avaliação de resultados de trabalhos profiláticos. Estudos semelhantes em outros países confirmam a necessidade de novos critérios. Na Argentina, ROMAÑA & ROMAÑA<sup>12</sup>, em um grupo de 174 chagásicos crônicos, comprovados pela xenodiagnose, obtiveram 22 reações negativas entre as 308 realizadas. No Chile, KNIERIM<sup>9</sup>, em um grupo de 29 pessoas com o xenodiagnóstico positivo, a RFC ofereceu 3,4% de resultados negativos e 7,0% de resultados duvidosos.

Quanto à utilização de antígenos diferentes para a mesma amostra de soro, verificou-se que os resultados nem sempre foram concordantes. Esta ocorrência parece sugerir a necessidade de estudos adicionais sobre o comportamento dos antígenos à prova sorológica. Quanto ao xenodiagnóstico, em si, pode concluir-se que, com sua repetição, três ou mais vezes, há grande probabilidade de se obter resultado positivo para pelo menos um dos exames. Essa observação reveste-se de importância para os trabalhos de terapêutica experimental, nos quais, com os recursos técnicos atualmente disponíveis, o xenodiagnóstico se constitui em elemento decisório; para esses ensaios, os dados presentemente disponíveis permitem recomendar que o xenodiagnóstico seja repetido pelo menos seis vezes.

## SUMMARY

*A comparative study between complement fixation test (using methylic and chloroformium-benzene extract antigens) and xenodiagnosis*

A comparison has been made between the data from the xenodiagnosis and the

complement fixation tests of 66 Chagas' disease patients living in the district of Bambuí, Minas Gerais, and found to be in the chronic phase of the disease, their diagnosis having been previously reached through the determination of the etiological agent. Though asked to submit themselves to both tests every month, for a period of one year, only irregularly did turned up for this purpose. From the 444 dependable complement fixation tests performed, 220 ones by using methylic antigen and 224, chloroformium-benzene extract antigen, 96.36% and 95.98%, respectively, were shown to be positive. Among 304 xenodiagnosis carried out at the time, however, only 34.21% were seen to be positive. From our data, 3 to 6 xenodiagnosis seem necessary to get a positive result. It was also observed that, sometimes, on a very same day, a patient's xenodiagnosis was found to be positive whereas his complement fixation test was shown to be negative. Some individuals also displayed a marked tendency to present positive results while others, on the contrary, usually produced negative results. It must then be emphasized the need for further investigation on the behaviour of antigens in serological tests as well as the significance of the present data regarding the selection of blood donors, clinical trials and the evaluation of prophylactic campaigns.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. O. de — Reação de fixação do complemento pela técnica quantitativa para moléstia de Chagas. Técnica em tubos e técnica em placas. In *Doença de Chagas*, 279-317, edição da Cadeira de *Terap. Clin. Fac. Med. Univ. Fed. Minas Gerais*, 1968.
2. ALMEIDA, J. O. de; PRATA, A.; ARJONA, A. C. & ARANTES, J. B. — Presença de inibidor específico de fixação de complemento, em antígenos preparados de *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 67:304-314, 1969.
3. ARAÚJO, F. G. & BATISTA, S. M. — Observações sobre os testes de fixação do complemento e imunofluorescência indireta em doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:104-110, 1969.
4. BATISTA, S. M. & SANTOS, U. M. — Antígeno metílico de cultura de "*Schizotrypanum cruzi*". *Hospital (Rio)* 56:1045-1051, 1959.
5. CERISOLA, J. A.; LAZZARI, J. O. & DI CORLETO, C. A. — El peligro de la transmisión de la infección chagásica por la transfusión de sangre en la ciudad de Buenos Aires. *Bol. Inform. — Dir. Enferm. Trans. Min. Asist. Soc. y Sal. Publica. (Publ. avulsa)* 3:12, 1964.
6. DIAS, E. — Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 35:335-342, 1940.
7. FREITAS, J. L. P. de — *Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório*. Tese. São Paulo, Fac. Med. Univ. São Paulo, 1947. 160 págs.
8. FREITAS, J. L. P. de & ALMEIDA, J. O. de — Nova técnica de fixação do complemento para a doença de Chagas (Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*). *Hospital (Rio)* 35:787-800, 1949.
9. KNIERIM, F. — Resultados obtenidos con la reacción de fijación del complemento según el 50% de hemólisis en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chileno Parasit.* 14:5-6, 1959.
10. PELLEGRINO, J. — La Malattia di Chagas. *Gaz. Intern. Med. Chirurgia (Roma)* 59:519-588, 1954.
11. PELLEGRINO, J. — Doença de Chagas e transfusão de sangue. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 11:697-706, 1959.
12. ROMANA, C. & ROMANA, M. S. — Valor comparativo de la reacción de fijación de complemento y del xenodiagnóstico en un grupo de chagásicos crónicos. *An. Inst. Med. Reg.* 4:245-254, 1957.
13. SALGADO, A. A. & GODOY JÚNIOR, T. L. — Xenodiagnóstico mensais, durante um ano de observação, em chagásicos crônicos. Trabalho a ser submetido a publicação.
14. SALGADO, A. A. & PELLEGRINO, J. — Realização de inquérito sorológico em zona rural: processo prático para obtenção de amostras de sangue. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 12:359-360, 1960.

Recebido para publicação em 21/7/1969.