

VARIAÇÃO TEMPORAL DOS TÍTULOS DAS REAÇÕES SOROLÓGICAS NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS E SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO CLÍNICA

EDMUNDO ARTEAGA-FERNÁNDEZ, ANTONIO CARLOS PEREIRA BARRETO, BÁRBARA MARIA IANNI, CHARLES MADY, GIOVANNI BELLOTTI, FULVIO PILEGGI

Estudou-se a variação dos títulos sorológicos das reações de fixação do complemento, hemaglutinação passiva, imunofluorescência e ELISA, num período de quatro semanas consecutivas, em 13 pacientes portadores da moléstia de Chagas na sua fase crônica, com idade média de 32,5 anos, dos quais seis se encontravam na forma indeterminada e sete na cardíaca. Nenhum deles tinha sido submetido a tratamento específico.

Em todas as 208 amostras os quatro testes foram reagentes. A análise estatística não mostrou diferenças significativas ao nível de $p < 5\%$ entre os grupos na forma

indeterminada e cardíaca, nem entre os títulos obtidos para cada semana nos quatro testes realizados.

Concluiu-se, assim, que as variações temporais que existem nessas reações sorológicas não são estatisticamente significativas, e poderiam ser decorrentes de variação do nível de anticorpos relacionados a surtos de parasitemia. Além disso, os níveis dos títulos sorológicos não tem relação com a forma clínica em que o paciente se encontra.

Arq. Bras. Cardiol. 51/2:143-146—Agosto 1988

Desde que Guerreiro e Machado, em 1913¹, demonstraram anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* no soro de pacientes infectados, esta reação de fixação do complemento passou a levar o nome de seus autores, sendo largamente utilizada no diagnóstico da moléstia de Chagas. Posteriormente, outras reações sorológicas surgiram, sendo atualmente as mais utilizadas, além dessa, o teste de hemaglutinação e a imunofluorescência.

A sensibilidade e especificidade desses testes são bem conhecidas, não existindo dúvida quanto ao seu valor no diagnóstico da forma crônica da doença de Chagas. Entretanto, elas também são utilizadas, ao lado do xenodiagnóstico, como critério de cura de pacientes que se encontram nesta fase, submetidos a tratamento específico.

É descrita por vários autores²⁻⁴ a variabilidade dos títulos em pacientes que foram submetidos ou não a tratamento com drogas específicas, podendo, em alguns casos, haver negatização em algumas reações. Temos visto casos que se submeteram a tratamento específico em outros centros, ou a terapêuticas alternativas e que, pelo simples fato de terem um exame sorológico não reagente, são dados como curados. Outras vezes, a variação para títulos menores é referida

como “melhora” ou “controle” da moléstia. Nestes casos, ao realizarmos novamente dois ou três testes, eles se mostraram reagentes. Isto nos levou a estudar um grupo de pacientes na forma crônica da doença de Chagas, com o objetivo de observar essa variação e submeter esses dados a uma análise estatística rigorosa, assim como estabelecer uma possível correlação clínica.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudamos 13 pacientes em seguimento ambulatorial, 11 do sexo masculino e dois do feminino, com idade média de 32,5 anos, os quais se encontravam na fase crônica de Chagas e nunca haviam recebido tratamento específico.

Foram submetidos a avaliação clínica, eletrocardiograma de repouso e estudo radiológico do tórax em posição pósterio-anterior.

Na avaliação clínica, os 13 pacientes se encontravam em classe funcional I da “New York Heart Association” (NYHA); seis deles apresentavam eletrocardiogramas normais (forma indeterminada) e os demais apresentavam distúrbios da condução, principalmente a associação de bloqueio da divisão ântero-superior

Trabalho realizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas—FMUSP.

esquerda do feixe de His e bloqueio do ramo direito, caracterizando a forma cardíaca (tab. I). Todos os pacientes, tanto na forma indeterminada como aqueles com alterações eletrocardiográficas, apresentavam índice cardio-torácico normal.

De cada paciente foram retirados, em cada oportunidade, 20 ml de sangue, uma vez por semana, durante um período de quatro semanas. As reações sorológicas quantitativas realizadas foram as seguintes: reação de fixação do complemento, teste de hemaglutinação passiva, imunofluorescência e ELISA*, num total de 208 exames, realizados através de técnica padronizada no Instituto de Medicina de São Paulo.

Análise estatística — Para efeito, os dados foram separados inicialmente em dois grupos: o primeiro, formado por seis indivíduos que se encontravam na forma indeterminada e, o segundo, por sete indivíduos na forma cardíaca, com alterações eletrocardiográficas e sem insuficiência cardíaca congestiva (tab. I).

TABELA I—Alterações eletrocardiográficas (ECG) e valores do índice cárdio-torácico (ICT) na fase crônica da doença de Chagas.

Caso no	Idade (em anos)	Sexo	E C G	ICT
1	41	M	normal	0,56
2	21	M	normal	0,43
3	33	M	normal	0,38
4	33	M	normal	0,37
5	38	M	normal	0,51
6	30	M	normal	0,40
7	28	M	BDAS + BRD + ESV	0,46
8	30	M	BAV II + AFC	0,40
9	28	F	BDAS + BRD	0,48
10	42	M	BDAS + BRD	0,49
11	33	F	AFC + + ARV	0,43
12	27	M	BRD	0,42
13	44	M	BDAS + BRD	

BDAS—bloqueio da divisão ântero-superior do ramo esquerdo do feixe de His; BRD—bloqueio do ramo direito do feixe de His; ESV — extra-sístoles ventriculares; BAV II—bloqueio atrioventricular do 2º grau; AFC—atraso final de condução; ARV—alteração da repolarização ventricular.

TABELA II—Comportamento evolutivo das reações sorológicas na fase crônica da doença de Chagas.

Caso	Reação de fixação do complemento				Teste de hemaglutinação				Teste de imunofluorescência				Teste ELISA			
	1a. S	2.a.S.	3a. S.	4a.S.	1a. S	2.aS.	3a.S.	4a.S.	1a.S	2.aS.	3a.S.	4a.S.	1a.S	2.aS.	3a.S.	4a.S.
1	4	8	4	4	640	640	320	320	160	80	80	80	160	160	320	320
2	8	8	8	8	320	640	320	320	160	160	160	160	160	32	320	320
3	16	32	16	32	1280	1280	1280	640	640	640	640	640	2560	1280	1280	2650
4	16	16	16	16	1280	640	640	1280	160	320	320	160	640	640	640	640
5	16	16	16	16	1280	1280	640	640	320	160	320	320	1280	640	640	640
6	8	8	8	8	320	320	320	640	160	160	160	160	640	320	160	160
7	32	32	16	32	640	640	640	640	320	160	160	320	640	640	1280	640
8	32	16	32	16	640	640	640	640	320	320	320	320	1280	640	640	640
9	8	8	8	8	1280	1280	1280	1280	80	80	80	80	160	160	80	80
10	8	8	8	8	80	80	80	80	80	80	80	80	320	160	160	320
11	8	8	8	8	320	320	320	320	320	320	320	160	640	320	640	640
12	8	16	8	4	640	320	320	640	320	320	320	320	640	640	1280	160
13	4	4	4	8	640	640	320	320	320	640	320	320	320	320	320	320

* "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"

Os setores sorológicos foram realizados quatro vezes em cada indivíduo, obedecendo a intervalo de uma semana. A tabela II mostra os resultados das aplicações dos quatro testes nos 13 indivíduos. Os seis primeiros correspondem aos pacientes da forma indeterminada.

O objetivo da análise foi verificar diferenças estatisticamente significantes entre os resultados médios de dois grupos de indivíduos para cada teste, assim como entre os resultados médios de semana para semana, para cada teste.

As comparações entre os grupos envolveram amostras independentes, enquanto que as comparações entre as semanas foram realizadas no mesmo indivíduo. Este fato exige um esquema de análise de variância especial, que permite a partição do erro residual em duas partes, uma para da comparação especificada acima (análise de variância "Split Plot")⁵.

Como os resultados dos testes sorológicos obtidos por diluição, obedecendo a uma escala intervalar, este tipo de variável exige uma transformação antes de ser analisada estatisticamente e, nestes casos, a transformação indicada foi a logarítmica.

Os dados foram analisados com o auxílio do programa BMPD 2V "Analysis of variance and covariance repeated measures"⁶.

RESULTADOS

Quanto às provas sorológicas, todas as 208 amostras submetidas aos testes mostraram-se reagentes, sendo que os maiores títulos obtidos foram os dos testes de hemaglutinação e ELISA e os menores, os da reação de fixação do complemento (tab. II).

Pela análise estatística não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de $p < 5\%$ entre os títulos obtidos para o grupo na forma indeterminada (casos 1 a 6) e o grupo na forma cardíaca (casos 7 a 13), para as quatro reações sorológicas; da mesma forma, não houve diferença estatisticamente signifi-

cativa entre os títulos obtidos para cada semana, nas quatro reações sorológicas utilizadas (tab. III a VI).

Os valores do índice cárdio-torácico, obtidos através do estudo radiológico do tórax, foram submetidos à análise estatística pelo teste t de Student, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na forma indeterminada e na forma cardíaca, ou seja, em ambos os grupos a “função cardíaca” estava preservada na avaliação por este índice (tab. I).

TABELA III—Valores encontrados para a reação de fixação do complemento.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Entre grupos	1	0,01199	0,00119	0,04	0,8402
Resíduo 1	11	3,09345	0,29122		
Entre semanas	3	0,03531	0,01177	0,76	0,5223
Interação semana x grupo	3	0,02137	0,00712	0,46	0,7126
Resíduo 2	33	0,51189	0,01551		

F = valor da estatística do teste; P = nível descritivo de probabilidade

TABELA IV—Valores encontrados para o teste de hemaglutinação

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Entre grupos	1	0,32866	0,32866	0,86	0,3745
Resíduo 1	11	4,21972	0,38361		
Entre semanas	3	0,10867	0,03622	2,26	0,0999
Interação semana x grupo	3	0,02502	0,00834	0,52	0,6714
Resíduo 2	33	0,52915	0,01603		

TABELA V—Valores encontrados para o teste de imunofluorescência.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Entre grupos	1	0,00415	0,00415	0,01	0,9119
Resíduo 1	11	3,55788	0,32344		
Entre semanas	3	0,01411	0,00470	0,37	0,7786
Interação semana x grupo	3	0,01411	0,00470	0,37	0,7786
Resíduo 2	33	0,42505	0,01288		

F = valor da estatística do teste; P = nível descritivo de probabilidade.

TABELA VI—Valores encontrados para o teste ELISA*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	P
Entre grupos	1	0,13841	0,13841	0,31	0,5864
Resíduo 1	11	4,72082	0,42912		
Entre semanas	3	0,11000	0,03667	1,00	0,4054
Interação semana x grupo	3	0,5423	0,01808	0,49	0,6898
Resíduo 2	33	1,21095	0,03670		

* “Enzyme linked immunosorbent assay”

COMENTÁRIOS

A demonstração de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, através de testes sorológicos em pacientes na fase crônica da doença de Chagas, oscila entre um índice de positividade de 90-100% para o teste de fixação do complemento, e de 99-100% para os testes de hemaglutinação, imunofluorescência e ELISA⁷. Essas variações seriam decorrentes da falta de padronização de reagentes e dos procedimentos técnicos⁷, os quais aqui foram superados, visto que o índice de positividade obtido foi de 100% para as quatro reações acima referidas.

O comportamento evolutivo da reação de fixação do complemento na fase crônica da moléstia de Chagas mostra variabilidade nos seus títulos, conforme já demonstraram Rassi e col³ e Almeida e col⁴, em dosagens feitas mensalmente, sendo que ambos obtiveram, inclusive, resultados transitariamente negativos. Entretanto, em nenhum dos trabalhos foi feita uma análise estatística para observar se essas variações eram significativas.

Neste estudo observou-se essa variação nos quatro testes sorológicos, porém a análise estatística não foi significativa. A explicação para este fenômeno, segundo Almeida e col⁴, pelo menos no caso da reação de fixação do complemento, poderia ser decorrente de problemas ligados à colheita, preparo do material, acontecimentos de natureza laboratorial, ou relacionada ao estado imunológico da moléstia.

Provavelmente todas estas hipóteses interferem nesta variação dos títulos. Entretanto, duas merecem ressalva; a) os reagentes utilizados para as reações não são de fácil padronização e, portanto, a mudança de reagente pode ser fator mais importante na variação dos títulos; b) quanto ao estado imunológico, é possível que em determinados períodos ocorra variação do nível de anticorpos, provavelmente relacionada a surtos de parasitemia.

Acreditamos que nesta pesquisa este último é o mais importante, visto que todas as reações foram realizadas no Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, onde existe grande experiência acumulada e uma técnica padronizada que, ao nosso ver exclui esses fatores de natureza laboratorial como causa da variação dos títulos.

Com relação às formas clínicas, não observamos diferenças estatisticamente significantes que indicassem uma correlação entre os títulos obtidos pelas quatro reações sorológicas e a gravidade do comprometimento cardíaco, o que já foi referido por outros autores^{8,9}.

Podemos assim, concluir que existe uma variação temporal dos títulos nas reações sorológicas quantitativas de fixação do complemento, hemaglutinação, imunofluorescência e ELISA, não sendo, porém, estatisticamente significativas. Essa variação e os níveis dos títulos não têm relação com a forma clínica em que o paciente se encontra.

SUMMARY

The authors studied the changes in serologic tests (complement fixation, indirect fluorescent antibody, hemagglutination, and ELISA) during a four-week consecutive period in 13 patients with chronic Chagas' disease. The mean age was 32.5 years. Six had the indeterminate form and seven the cardiac type. None had received specific medication before or during the study.

All 208 samples were positive. The statistical analysis showed no difference ($p < 0.05$) between the two groups (indeterminate and cardiac form), nor among the sequential titers of each patients.

The authors concluded that changes in the serologic tests are not statistically important and could be the result of variations of antibody levels related to periods of parasitemia.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Drs. Mário Camargo e Benedito A. Peres, do Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela realização dos testes sorológicos, e ao Professor Clóvis de Araujo Peres, do Departamento de Estatística do IME-USP, pela realização da análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. Guerreiro C, Machado A — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico Brasil Med, 27: 225, 1913.
2. Freitas JLP, Almeida JO — Nova técnica da fixação do complemento para moléstia de Chagas (reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*). Hospital (Rio), 35: 787, 1963.
3. Rassi A, Amato Neto V, Siqueira AF — Comportamento evolutivo da reação de fixação do complemento na fase crônica da moléstia de Chagas. Rev Inst Med Trop, São Paulo, 11: 430, 1969.
4. Almeida JWR, Camargo ME, Amato Neto V — Comportamento evolutivo da reação de fixação do complemento quantitativa na fase crônica da doença de Chagas, sem influência de tratamento específico. Rev Inst Med Trop São Paulo, 22: 78, 1980.
5. Neter J, Wasserman W — Applied Linear Statistical Models: Regression Analysis of Variance and Experimental Design. Homewood. Richard D. Irwin, 1974. p. 842.
6. Dixon WJ — BMDP Statistical Software. Berkeley, Univ of California Press, 1981.
7. Camargo ME, Takeda GKF — Diagnóstico de laboratório In: Brener Z, Andrade Z — *Trypanosoma Cruzii* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Kooga, 1979. p. 175.
8. Gusmão R, Rezende JM, Rassi A, Neva FA — Relationships between clinical status and immune response in Chagas' disease. In: Congresso Internacional sobre Doença de Chagas (Abstract). Rio de Janeiro, 1979. p. 217.
9. Araujo S^o AQ, Pereira Barretto AC, Camargo M, Mady C, Wajngarten M, Dauar D, Martinelli F^o M, Macruz R, Pileggi F — Reações sorológicas quantitativas na doença de Chagas: relação clínico-laboratorial em 100 pacientes. Arq Bras Cardio, 36: 413, 1981.